

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA



SCUOLA DI DOTTORATO

Sanità e Produzioni Animali: Scienza, Tecnologia e Biotecnologie

Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica

Dottorato di Ricerca In Igiene Veterinaria e Patologia Animale

XXIV Ciclo

**L'uso dell'istologia nel controllo degli alimenti di origine animale con
particolare riferimento ai prodotti ittici**

Docente Guida: Prof. Eugenio SCANZIANI

Tutor esterno: Dr.ssa Elena BOZZETTA

Coordinatore: Prof. Giuseppe SIRONI

Tesi di: Dott.ssa Marzia PEZZOLATO

Matricola n. R08122

ANNO ACCADEMICO 2010/11

INDICE

1. Introduzione

2. Legislazione nel campo del controllo degli alimenti ittici

2.1 Legislazione del pesce e dei prodotti della pesca

3. Analisi microscopica dei cibi

3.1 Introduzione

3.2 Tecniche microscopiche

3.3 Microscopia ottica

3.3.1 Microscopia ottica in campo chiaro

3.3.2 Microscopia ottica a luce polarizzata

3.3.3 Microscopia ottica a fluorescenza

3.3.4 Microscopia confocale

3.4 Microscopia Elettronica

3.5 Microscopia a Forza Atomica

3.6 Preparazione del campione

3.6.1 Microscopia ottica

3.6.2 Microscopia Elettronica

3.7 Applicazioni

3.7.1 Contaminazione del cibo

3.7.2 Analisi strutturale

3.7.2.1 Carne

3.7.2.2 Prodotti lattiero caseari

3.7.2.3 Cibi di origine vegetale

3.8 Evoluzione nell'analisi microscopica degli alimenti

4. Tecniche di microscopia per lo studio di prodotti ittici

4.1 Microscopia ottica

4.1.1 Preparazione del campione per MO

4.2 Microscopia elettronica

5. Anatomia muscolare e funzione

5.1 Microstruttura

6. Differenziazione di pesce fresco e surgelato- scongelato

6.1 Introduzione

6.2 Esame dell'opacità del cristallino dell'occhio

6.3 Misurazione della resistenza elettrica

6.4 Determinazione del valore di ematocrito ed esame degli eritrociti

6.5 Metodi enzimatici

6.6 Analisi spettroscopica

6.7 La risonanza magnetica nucleare (NMR)

6.8 Microscopia NIR

6.9 Considerazioni

7. Scopo del lavoro

8. Materiali & Metodi

8.1 Primo esperimento

8.1.1 Disegno dell'esperimento

8.1.2 Campionamento ed analisi istologica

8.1.3 Analisi statistica

8.2 Secondo esperimento

8.2.1 Disegno dell'esperimento

8.2.2 Campionamento ed analisi istologica

8.2.3 Analisi statistica

8.3 Terzo esperimento

8.3.1 Disegno dell'esperimento

8.3.2 Campionamento

8.3.3 Esame istologico

8.3.4 Analisi statistica

8.3.5 Analisi batteriologiche

8.3.6 Analisi virologiche

8.3.7 Analisi chimiche

8.3.8 Identificazione di specie

9. Risultati

9.1 Primo esperimento

9.2 Secondo esperimento

9.3 Terzo esperimento

9.3.1 Esame istologico

9.3.2 Analisi batteriologiche

9.3.3 Analisi virologiche

9.3.4 Analisi chimiche

9.3.5 Identificazione di specie

10. Discussione e conclusioni

11. Ringraziamenti

12. Bibliografia

1. Introduzione

La sicurezza alimentare è intesa nella sua accezione più ampia come la possibilità di garantire in modo costante e generalizzato acqua ed alimenti per soddisfare il fabbisogno energetico di cui l'organismo necessita per la sopravvivenza e la vita, in adeguate condizioni igieniche. La definizione comunemente accettata a livello internazionale è quella elaborata al World Food Summit nel 1996 secondo la quale essa descrive una situazione in cui: “tutte le persone, in ogni momento, hanno accesso fisico, sociale ed economico ad alimenti sufficienti, sicuri e nutrienti che garantiscano le loro necessità e preferenze alimentari per condurre una vita attiva e sana”.

Dal punto di vista prettamente sanitario la sicurezza alimentare è intesa anche come sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti. Nell'accezione giuridica l'alimento (o «prodotto alimentare», o «derrata alimentare») è definito come qualsiasi sostanza o prodotto trasformato, parzialmente trasformato o non trasformato, destinato a essere ingerito, o di cui si prevede ragionevolmente che possa essere ingerito, da esseri umani (Reg. 178/2002). Questa definizione fa sì che i controlli ufficiali vengano eseguiti sia sui prodotti presenti in commercio sia su tessuti animali destinati ad essere consumati dall'uomo. Esempio caratterizzante è rappresentato dai controlli eseguiti sui tessuti degli animali macellati al fine di valutare l'igiene e la salubrità dell'animale e per valutare se le modalità di allevamento a cui l'animale è stato sottoposto abbiano rese idonee le sue carni al consumo alimentare. Oggi molta attenzione viene posta nei controlli dei farmaci impiegati in maniera lecita o illecita durante l'allevamento per impedire che sostanze non dichiarate ed eventualmente dannose per il consumatore possano essere presenti nel prodotto finale. Analizzando la bibliografia si evidenzia che l'analisi microscopica dei tessuti animali finalizzata al controllo dell'utilizzo dei farmaci è da tempo conosciuta (Guarda *et al.*, 1983) e che negli ultimi anni tali metodiche spesso considerate obsolete sono state standardizzate e se ne sono valutate le performance fino a dimostrarne la valenza ed inserirle tra i controlli ufficiali. (Cannizzo *et al.*, 2010; Bozzetta *et al.*, 2011; Pezzolato *et al.*, 2011; Uslenghi *et al.*, 2012; Vascellari *et al.*, 2012).

Nel corso del periodo di dottorato ho svolto numerose ricerche nel campo dell'analisi morfologica applicata alla valutazione sanitaria degli alimenti di origine animale, studiando le alterazioni indotte negli organi target dall'utilizzo illecito di

sostanze anabolizzanti nella specie bovina. In particolare lo studio è proceduto prima individuando le alterazioni specifiche indotte dall'utilizzo di estrogeni in vitelli individuando la precisione del metodo e standardizzando la lettura microscopica dei preparati istologici (Pezzolato *et al.* 2011) ed è continuato con l'individuazione di un marker immunoistochimico correlato al trattamento con 17 β estradiolo (Pezzolato *et al.*, in press), sostanza vietata per gli animali destinati al consumo umano perché potenzialmente cancerogena. Contemporaneamente ho studiato le alterazioni indotte a livello timico dall'utilizzo illecito dei cortisonici in vitelli, individuando i parametri microscopici correlati con i trattamenti illeciti (Bozzetta *et al.*, 2011). I miei studi però si sono anche concentrati sull'analisi dei prodotti ittici (Bozzetta *et al.*, 2012) e nella presente tesi vengono riportate le osservazioni condotte su questo ultimo aspetto.

L'analisi dei consumi alimentari, però, oltre a confermare un incremento del consumo *pro capite* di carne, mostra un elevato consumo di pesce. Il commercio dei prodotti ittici ha registrato, negli ultimi dieci anni, un considerevole incremento sia in campo nazionale che internazionale. La maggiore richiesta interessa pesci, crostacei e molluschi sia freschi che congelati, oppure sottoposti a differenti processi di lavorazione (affumicamento, salagione, ecc.). Tale tendenza può essere attribuita a diversi fattori tra loro concomitanti nel determinare una rapida crescita della domanda e, come conseguenza, dell'offerta. È da considerare che la crescente affermazione di sistemi di vendita online e di mercati ittici elettronici, ha notevolmente ampliato la capacità di offerta degli operatori, grazie anche alle economie di scala determinate dall'ampliamento dei mercati, accrescendo le potenzialità d'acquisto dei consumatori.

Inoltre, ha contribuito ad orientare le scelte dei consumatori la maggiore e sempre più diffusa educazione alimentare e la conseguente rinnovata attenzione al livello qualitativo dei prodotti posti in commercio. All'affermazione del prodotto ittico come componente della dieta quotidiana, hanno contribuito in modo determinante le sue qualità intrinseche, ovvero "l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche che influenzano l'accettabilità per il consumatore finale" (Howgate., 1982), proprietà ben attribuibili ai prodotti della pesca. Infatti, tali prodotti sono attualmente percepiti dal consumatore come alimenti in sé sani e dietetici, di elevato valore nutritivo. Inoltre, sotto l'aspetto dietetico, i prodotti ittici sono dotati di caratteristiche nutrizionali più che apprezzabili, in quanto ricchi di "omega 3", che agendo come depressori sull'attività piastrinica, conferiscono benefici al distretto cardiovascolare; essi, infatti, determinano la diminuzione del Trombossano (TXA₂), che esercita attività anti-aggregante, e l'aumento della

prostaciclina PG13 fortemente antiaggregante e vasodilatatrice. E' noto che gli acidi grassi "omega-3" hanno effetti benefici nella prevenzione primaria e secondaria dell'aterosclerosi ed effetto antiaritmico sulla frequenza cardiaca per la quale è nota l'affermazione "maggiore variabilità cardiaca, maggiore salute".

A conferma dell'importanza economica mondiale che sta assumendo il consumo dei prodotti ittici la FAO ha indicato negli ultimi anni un incremento nella produzione di pesci, crostacei e molluschi rispetto agli anni precedenti.

Per l'Italia l'I.C.R.A.M. (Istituto Centrale per la Ricerca Scientifica e Tecnologica Applicata al Mare) ha rilevato un aumento del commercio del complesso dei prodotti ittici su scala nazionale, registrando un consumo procapite in crescita dall'inizio del nuovo millennio. A fronte di questi elevati trend di crescita della domanda interna la produzione nazionale di prodotti ittici non è stata tale da soddisfare la domanda interna e, contemporaneamente, sostenere l'esportazione. Come si evidenzia da dati ISTAT, per soddisfare la domanda del mercato nazionale si è avuta la necessità d'importazione del 22% del consumo totale dei prodotti ittici. Ciò ha comportato l'ingresso di nuove specie, non usuali sui nostri mercati, per le quali spesso non esiste la denominazione in lingua italiana e che possono essere vendute in luogo di specie più comuni e maggiormente apprezzate e richieste dal consumatore.

Appare evidente che il transito sul mercato di partite di derrate alimentari ittiche di considerevole entità non può che esigere adeguati controlli, che, nell'intento primo di tutelare il consumatore, possano garantire le qualità sensoriali, nutrizionali, funzionali e microbiologiche che hanno, nel passato recente, determinato lo sviluppo e l'affermazione del prodotto ittico nella dieta del consumatore italiano ed europeo. D'altra parte, a seguito dell'entrata in vigore dei nuovi Regolamenti comunitari, l'insieme del settore industriale agro-alimentare europeo si trova nella necessità di dovere affrontare la concreta realizzazione di un sistema di controllo affidabile della sicurezza e della qualità degli alimenti, dalla produzione delle materie prime alla distribuzione del prodotto finale destinato al consumatore.

Solo l'attuazione ed il conseguimento di tale obiettivo permetterà di fornire reali garanzie di sicurezza, salubrità e qualità degli alimenti al consumatore e di consolidare le posizioni raggiunte sul mercato dei prodotti alimentari (Reg. 178/2002).

Sinora la sicurezza degli alimenti, pur garantita per legge, non è stata sempre assicurata, soprattutto a causa di specifiche mancanze nei sistemi di controllo lungo la filiera produttiva. Tali evenienze hanno accresciuto notevolmente le preoccupazioni del

consumatore e hanno fatto emergere l'esigenza di una completa trasparenza, con garanzia della tracciabilità dei prodotti destinati al consumo umano, come indicato negli articoli dei regolamenti comunitari del Pacchetto Igiene.

Su questa linea i legislatori europei hanno rivolto maggiore attenzione alle procedure per garantire la sicurezza e la qualità del prodotto, riconoscendo la necessità di ottenere prodotti che abbiano i requisiti di igienicità, gli aspetti di qualità e/o tipicità, e le garanzie di procedimenti produttivi rispettosi del benessere animale e della conservazione dell'ambiente.

Le considerazioni dei rappresentanti dei Paesi Europei sono state concordi nel riconoscere che, per venire incontro alle necessità d'informazione dei consumatori e per fornire loro maggiore sicurezza è necessario realizzare un'etichetta che descriva la qualità "tecnica" del pesce. In quest'ambito si inserisce l'analisi microscopica dei tessuti che deve essere sviluppata e valutata al fine di poter rendere efficaci i controlli sulle modalità di conservazione dei prodotti ittici immessi sul mercato.

2. Legislazione nel campo del controllo degli alimenti ittici

La legislazione europea sulla sicurezza alimentare si prefigge lo scopo di semplificare e armonizzare i numerosi requisiti di igiene che scaturiscono dalle direttive del campo della pesca. Lo scopo ultimo è quello di creare un'unica normativa che comprenda tutti i settori degli alimenti, che inglobi le norme per gli operatori assieme con gli strumenti per gestire la sicurezza alimentare e qualsiasi crisi alimentare che possa scaturire in qualsiasi punto della catena.

Le procedure nel campo alimentare, infatti, dovrebbero prima di tutto assicurare la sicurezza del cibo attraverso l'uso del sistema HACCP.

2.1 Legislazione del pesce e dei prodotti della pesca

La politica di sicurezza alimentare dell'UE abbraccia l'intera catena alimentare. I regolamenti UE sono tra i più rigorosi al mondo e delineano la responsabilità dei produttori e fornitori per contribuire a garantire la qualità e la sicurezza degli alimenti.

Nella legislazione dell'UE, ci sono numerose norme che si riferiscono a questioni di sicurezza alimentare e coprono molti tipi di prodotti alimentari, tra cui pesce e prodotti della pesca. In particolare, il regolamento (CE) n 178/2002 (Reg. 178/2002) (entrato in vigore il 1° gennaio 2005) stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. Il regolamento (CE) N. 852/2004 (Reg. 852/2004) (entrato in vigore il 1° gennaio 2006) stabilisce norme generali per gli operatori del settore alimentare in materia di igiene dei prodotti alimentari. Il regolamento (CE) N. 853/2004 (Reg. 853/2004) (entrato in vigore il 1° giugno 2006) stabilisce norme specifiche di igiene per gli alimenti di origine animale. Il regolamento (CE) N. 854/2004 (Reg. 854/2004) (entrato in vigore il 1° gennaio 2006), stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali, e, infine, il regolamento (CE) n 882/2004 (Reg. 882/2004) (entrato in vigore 1 gennaio 2006) stabilisce le norme generali per l'esecuzione dei controlli ufficiali intesi a verificare il rispetto delle norme volte a prevenire, eliminare o ridurre i livelli accettabili di rischio per l'uomo e gli animali.

Ai sensi della direttiva 79/923/CEE (Dir. 923/79) gli Stati membri:

1. entro due anni a decorrere dalla notifica della presente direttiva, devono designare delle acque destinate alla molluschicoltura;

2. possono in seguito procedere a designazioni complementari;
3. possono sottoporre a revisione la designazione di certe acque, a causa in particolare di elementi imprevisi al momento della designazione;
4. stabiliscono programmi per ridurre l'inquinamento e far sì che le acque designate siano conformi ai valori fissati dagli Stati membri.

A seguito della direttiva 91/67/CEE (Dir 67/91) (entrata in vigore il 1° gennaio 1993), l'immissione sul mercato di animali d'acquacoltura sono soggetti ai seguenti requisiti generali:

1. non devono presentare alcun segno clinico di malattia il giorno del carico;
2. non devono essere destinati alla distruzione o alla macellazione nel quadro di un piano di eradicazione di una malattia;
3. essi non devono provenire da un'azienda oggetto di un divieto per motivi di polizia sanitaria e non devono essere venuti a contatto con animali di tali aziende.

A seguito della direttiva 91/492/CEE (Dir. 492/91) (data di entrata in vigore 14 ottobre 1991), l'immissione sul mercato di molluschi bivalvi vivi destinati al consumo umano sono soggetti alle seguenti condizioni:

1. essi devono provenire da zone di produzione, che sono conformi alle prescrizioni stabilite dalla presente direttiva, nel caso di pettinidi, questa disposizione si applica solo ai prodotti dell'acquacoltura;
2. siano stati raccolti e trasportati dalla zona di produzione al centro di spedizione, centro di purificazione, zona di stabulazione, o di trasformazione alle condizioni previste dalla presente direttiva;
3. nei casi previsti dalla presente direttiva, devono essere stati pescati in zone riconosciute;
4. devono essere stati manipolati in condizioni igieniche e, ove necessario, devono essere stati depurati in stabilimenti riconosciuti;
5. essi devono essere conformi ai criteri di cui alla presente direttiva;
6. essi devono esser stati sottoposti a controllo sanitario;
7. devono essere stati debitamente confezionati;
8. essi devono esser stati conservati e trasportati in condizioni igieniche soddisfacenti;
9. essi devono recare un bollo sanitario.

Per quanto riguarda la direttiva 91/493/CEE (Dir 493/91) (entrata in vigore il 1° gennaio 1993), l'immissione sul mercato dei prodotti dell'acquacoltura è subordinata alle seguenti condizioni:

1. siano stati macellati in condizioni appropriate di igiene;

2. siano stati manipolati e, se del caso, imballati, preparati, trasformati, congelati, scongelati o immagazzinati in condizioni igieniche in stabilimenti e devono essere stati conservati e trasportati in condizioni igieniche soddisfacenti.

L'immissione sul mercato dei seguenti prodotti è vietata:

1. pesci velenosi delle seguenti famiglie: Tetraodontidae, Molidae, Diodontidae, Canthigasteridae;
2. prodotti contenenti biotossine, quali ciguatossina o le tossine che paralizzano i muscoli.

La direttiva 92/48/CEE (Dir. 48/92) (entrata in vigore il 1° gennaio 1993) chiarisce che le parti delle navi o i recipienti riservati alla conservazione dei prodotti della pesca non devono contenere oggetti o prodotti che potrebbero trasmettere proprietà nocive o caratteristiche anomale ai prodotti alimentari. Tali parti o recipienti devono essere ben progettato in modo da consentire loro di essere puliti facilmente I prodotti della pesca sono manipolati e immagazzinati in modo da evitare danneggiamenti.

Lo scopo della direttiva 2000/60/CE (Dir. 60/2000) (entrata in vigore il 22 dicembre 2000) è quello di istituire un quadro per la protezione delle acque superficiali interne, delle acque di transizione, delle acque costiere e acque sotterranee che:

1. impedisca un ulteriore deterioramento, protegga e migliori lo stato degli ecosistemi acquatici e, per quanto riguarda le loro esigenze di acqua, degli ecosistemi terrestri e delle zone umide direttamente dipendenti dagli ecosistemi acquatici;
2. agevoli un utilizzo idrico sostenibile fondato sulla protezione a lungo termine delle risorse idriche disponibili;
3. miri alla protezione rafforzata e al miglioramento dell'ambiente acquatico, anche attraverso misure specifiche per la graduale riduzione degli scarichi, delle emissioni e delle perdite di sostanze prioritarie e l'arresto o la graduale eliminazione di scarichi, emissioni e perdite delle sostanze pericolose prioritarie;
4. assicuri la graduale riduzione dell'inquinamento delle acque sotterranee e ne impedisca l'aumento;
5. contribuisca a mitigare gli effetti delle inondazioni e della siccità.

La direttiva 2006/88/CE (Dir. 88/2006) (entrata in vigore 14 dicembre 2006), ha istituito:

1. condizioni di polizia sanitaria per l'immissione sul mercato, l'importazione e il transito degli animali d'acquacoltura e dei loro prodotti;
2. misure minime per prevenire le malattie degli animali d'acquacoltura;

3. misure minime da adottare in risposta a casi di presunta o accertata malattia in questi animali..Sono incluse le seguenti malattie: necrosi ematopoietica epizootica, l'infezione da *Bonamia exitiosa*, infezione da *californiensis Xenohaliotis*, sindrome di Taura, o anche malattia della testa gialla.

La decisione 97/296/CE (Dec. 296/97) (entrata in vigore il 1° luglio 1997), indica gli elenchi dei paesi e territori dai quali è autorizzata l'importazione di prodotti di pescatori, sotto qualsiasi forma destinate al consumo umano.

Il regolamento (CE) No.104/2000 (Reg. 104/2000) (entrata in vigore il 2 febbraio 2000) sostiene, ai fini del presente regolamento, che per organizzazione di produttori si intende qualsiasi persona giuridica:

1. istituito per iniziativa di un gruppo di produttori di uno o più prodotti, nel caso di prodotti congelati, trattati o trasformati, le operazioni in questione siano state effettuate a bordo delle navi da pesca;
2. costituita allo scopo di assicurare che la pesca viene effettuata lungo razionali linee e che le condizioni per la vendita dei prodotti dei soci sono migliorate, mediante misure volte a stimolare la pianificazione della produzione, promuovere la concentrazione dell'offerta, stabilizzare i prezzi, promuovere metodi di pesca;
3. le regole di associazione che richiedono agli aderenti, di applicare alla produzione di pesca e di commercializzazione.

3. Analisi microscopica dei cibi

3.1 Introduzione

Molti cibi hanno un'origine biologica che viene modificata a diversi gradi e/o livelli a seconda dei cicli produttivi che subiscono. Esempi caratteristici che descrivono a vario livello le modificazioni che possono subire i cibi sono: la transizione da farina a pane, la trasformazione da muscolo a insaccato o ancora il passaggio da latte a formaggio. Nonostante questi cambiamenti i cibi possono essere categorizzati in accordo con le loro caratteristiche strutturali in: cibi liquidi, che possono presentarsi come sospensioni o emulsioni (bevande come il latte, i succhi di frutta, le salse, ecc); cibi spumosi (creme pasticcere), cibi viscosi con basso contenuto di grassi (yoghurt, marmellate) o ad alto contenuto (margarina, burro), cibi solidi (carne, pesce, pane) o ancora cibi in polvere (spezie, farine). Spesso però i cibi finiti derivano da combinazioni di cibi categorizzati in gruppi diversi. L'approccio utilizzato nell'analisi microscopica dei cibi dipende sia dalla natura del cibo che dall'obiettivo dell'analisi. La storia dello studio microscopico del cibo e i principi dell'analisi dei differenti gruppi di cibi sono stati revisionati agli inizi degli anni novanta da Aguilera e Stanley (1990).

3.2 Tecniche microscopiche

3.3 Microscopia ottica

Microscopia in campo chiaro, microscopia a fluorescenza o a luce polarizzata sono le tecniche di microscopia ottica più frequentemente utilizzate nel campo del controllo degli alimenti (Aguilera *et al.*, 2000). Lo strumento base utilizzato è un microscopio a campo chiaro al quale vengono aggiunti dispositivi per l'utilizzo con luce polarizzata o a fluorescenza.

3.3.1 Microscopia ottica in campo chiaro

La microscopia ottica in campo chiaro è regolarmente impiegata nel campo del controllo alimentare per ottenere informazioni qualitative rapide sulla struttura e composizione dei cibi. La prima applicazione di questa tecnica nel campo della sicurezza alimentare è stata per identificare le adulterazioni e le contaminazioni. L'adulterazione di un alimento, infatti, consiste nella variazione illecita e fraudolenta della composizione di un prodotto alimentare

mentre la contaminazione consiste nella presenza di sostanze estranee di varia origine, entrambe valutabili microscopicamente. (Lewis, 1993)

Una grande varietà di colorazioni possono essere utilizzate in microscopia ottica, ma tuttavia quelle utilizzate per il controllo alimenti non sono molte. Colorazione base è l'ematossilina eosina che permette di studiare la microstruttura degli alimenti, soprattutto di quelli solidi tra cui la carne ed il pesce. Tra le altre principali colorazioni ricordiamo inoltre il blu di toluidina, un colorante metacromatico che produce colori diversi a seconda della natura del componente a cui si lega, divenendo ad esempio porpora o rosso brillante se legato alle pareti delle cellule vegetali contenenti pectina o blu scuro se si lega alle cellule vegetali lignificate dei tessuti di conduzione. Il blu di toluidina è utile anche per l'analisi dei prodotti a base di carne, in quanto le fibre muscolari appaiono rosa pallido, i fibroblasti divengono blu e le fibre elastiche turchesi. Tale colorazione è inoltre usata per identificare l'amido che assume una colorazione blu caratteristica permettendone l'identificazione e la localizzazione anche a seguito di processazioni che ne distruggono la struttura stessa.

3.3.2 Microscopia ottica a luce polarizzata

Il microscopio con luce polarizzata viene invece impiegato solo per analizzare i cibi che possiedono birifrangenza propria dovuta alla loro struttura cristallina ordinata. Molti elementi possiedono questa caratteristica, tra i principali ricordiamo l'amido, le pareti cellulari, le fibre muscolari, il grasso sia animale che vegetale e molti tipi di aromi.

3.3.3 Microscopia ottica a fluorescenza

La fluorescenza fornisce una sensibilità che non è disponibile con altre forme di microscopia ottica, consentendo la rivelazione della fluorescenza di composti presenti in quantità molto ridotte. Una vasta gamma di componenti degli alimenti, sia di origine vegetale che animale, mostra fluorescenza intrinseca (autofluorescenza). Nelle piante, questi elementi includono pigmenti come le clorofille ed i carotenoidi, nonché composti fenolici vari come lignine e componenti a basso peso molecolare come i composti aromatici. Anche molte erbe e spezie sono anche dotate di autofluorescenza

Nei tessuti animali, le fonti più comuni di autofluorescenza sono ossa, cartilagine, collagene, elastina e alcuni lipidi.

Inoltre, la fluorescenza può essere indotta da una vasta gamma di composti quali coloranti fluorescenti, anticorpi specifici o lectine che vengono coniugati con marcatori fluorescenti, e sostanze che reagiscono solo in ambienti chimici specifici. Per esempio,

Calcofluoro, un fluorescente brillantante, può essere utilizzato come sonda altamente specifica per localizzare il legame misto (1-3), (1-4)-bD-glucano nei cereali. Il Nil red è un colorante liposolubile che diventa intensamente fluorescente nei medium idrofobi.

La precisa identificazione e localizzazione dei vari componenti, insieme con la sensibilità della tecnica fluorescenza, ha permesso alla microscopia a fluorescenza di essere ritenuta un valido strumento di analisi alimentare (Kala^ˆb *et al.*, 1995)

3.3.4 Microscopia confocale

La microscopia confocale è stata sviluppata come una tecnica con alcuni vantaggi per l'analisi degli alimenti. (Ferrando *et al.*, 2000)

La principale differenza tra una microscopia convenzionale ed una confocale è il posizionamento di un foro in corrispondenza del piano focale dell'immagine nel caso dello strumento confocale. Questo rimuove l' "out-of-focus" luce, generando un'immagine chiara e consentendo il sezionamento ottico del campione. Ci sono due tipi fondamentali di microscopia confocale: la microscopia confocale tandem a scansione (CSTM) e la microscopia confocale a scansione laser (CSLM). Il CSTM utilizza mercurio, tungsteno, o illuminatori xenon e ha il vantaggio di consentire l'osservazione in tempo reale del campione. La bassa intensità di luce può essere un problema con questa tecnica. La CSLM usa illuminazione laser. La dotazione standard comprende un laser ad argon (488 e 514 nm lunghezze d'onda) con o senza elio-neon laser (633 nm lunghezza d'onda). In molti dei sistemi CSLM attualmente in uso, l'osservazione in tempo reale non è disponibile a causa di potenziali danni per l'occhio da emissioni laser. Le immagini sono prodotte, immagazzinate e manipolate da software di gestione delle immagini. L'intensità della luce non è un problema con questo metodo.

Il CSLM può fornire immagini focalizzate ad una profondità fino a diverse centinaia di micrometri, a seconda della natura del campione, in modo che le sezioni sequenziali possono essere ottenute per la ricostruzione tridimensionale dell'immagine. Inoltre, i componenti chimici diversi (ad esempio, le proteine e i grassi) possono essere identificati e localizzati simultaneamente utilizzando specifici marcatori fluorescenti. CSLM è stato utilizzato per l'analisi quantitativa di strutture cellulari in materiale vegetale, per l'analisi strutturale di emulsioni di complessità differenti, e per la posizione di microrganismi in una vasta gamma di prodotti alimentari

3.4 Microscopia Elettronica

La microscopia elettronica (EM) viene utilizzata quando è richiesto una risoluzione superiore a quella ottenibile con tecniche di microscopia ottica, ad esempio, per l'analisi di componenti quali micelle di caseina del latte o fibre di pectina di frutta e verdura, che sono troppo piccole per essere visualizzate in microscopia ottica. Esistono due tipi di microscopia elettronica, quella a scansione (SEM) in combinazione con microanalisi a raggi X, e quella a trasmissione (TEM) nella modalità di spettrometria di perdita di energia di elettroni (EELS), che consente l'analisi di alimenti o loro componenti per studiarne la composizione elementare. SEM di campioni idratati congelati e TEM di campioni fissati dal congelamento rapido forniscono immagini strutturali di alimenti non affetti da artefatti indotti dalla fissazione chimica. In contrasto, la fissazione chimica seguita da inclusione in resina e colorazione di sezioni ultrasottili con metalli pesanti (acetato di uranile e / o citrato di piombo), rende possibile distinguere alcuni elementi quali proteine, grassi insaturi ed alcuni polisaccaridi negli alimenti. (Kala¹ *et al.*, 1995)

3.5 Microscopia a Forza Atomica

I rilevanti cambiamenti strutturali indotti sugli ingredienti alimentari durante la preparazione del campione per la microscopia elettronica richiedono lo sviluppo di metodi innovativi per ottenere risultati migliori. Infatti, le tecniche per microscopia elettronica sono spinte al massimo quando vengono usate per studiare biopolimeri complessi come le proteine e i polisaccaridi rendendo necessario il rivestimento di questi tipi di campioni con metalli, ma proprio la dimensione dei grani metallici limita il livello di dettaglio osservabile nelle immagini finali. Per porre rimedio a questo problema si è sviluppata la microscopia a forza atomica (AFM) che crea un'immagine attraverso il movimento di uno stilo affilato (penna), attaccato ad un cantilever flessibile, che passa attraverso la superficie del campione. Quando la penna si avvicina al campione, forze repulsive deviano il cantilever lontano dalla superficie e questi movimenti possono essere registrati. Questa tecnica semplice e molto sensibile è in grado di misurare deformazioni causate anche da singole molecole e atomi è stata per questo motivo ampiamente utilizzata per studiare componenti alimentari complessi, come fibrille proteiche e polisaccaridi (Kirby *et al.*, 1995)

3.6 Preparazione del campione

3.6.1 Microscopia ottica

Nel campo della sicurezza alimentare ove possibile viene esaminato materiale fresco al fine di evitare artefatti dovuti alla fissazione, per prevenire la perdita di alcuni costituenti ed ancora per abbreviare i tempi di analisi

Le polveri vengono esaminate nella loro forma originale disperdendole in montanti sia acquosi che non, a seconda della loro solubilità e disperdibilità. Nei montanti si possono aggiungere inoltre coloranti per aumentare il contrasto dei singoli componenti strutturali per facilitare l'osservazione e la discriminazione sulla base di caratteristiche chimiche e morfologiche.

Lo striscio e/o lo schiacciamento del campione sono tecniche di preparazione semplici che permettono di ottenere informazioni dettagliate ed in tempi rapidi sui componenti del cibo. A seconda della consistenza, il prodotto viene miscelato con opportuni coloranti o viene sminuzzato in una piccola quantità di acqua o può anche essere preparato semplicemente per schiacciamento tra il vetrino e il coprioggetto. Usando questi metodi e colorazioni appropriate si possono ottenere informazioni preziose sui componenti del cibo, sebbene la microstruttura complessiva viene generalmente persa.

Se le informazioni sulla composizione chimica o relazioni strutturali e spaziali dei componenti è necessaria il campione viene sottoposto ad opportuna preparazione prima dell'esame microscopico. La procedura più semplice e più veloce parte con la selezione di un campione rappresentativo dell'alimento e la sua fissazione. La fissazione per congelamento permette di ottenere sezioni in un tempo relativamente breve e i preparati allestiti hanno il vantaggio di presentare pochi artefatti se si escludono quelli dovuti ai cristalli di ghiaccio. Il danno dovuto ai cristalli di ghiaccio può essere minimizzato congelando il campione in azoto e sezionandolo in un criostato. E' essenziale eseguire una lavorazione rapida, poiché i cristalli di ghiaccio crescono non appena il campione si riscalda alla temperatura del criostato. La Fissazione con glutaraldeide o formaldeide invece impedisce la disintegrazione delle sezioni sottili durante le successive colorazioni. Alcuni componenti però ed in particolare alcuni polisaccaridi, non possono essere stabilizzati dai fissativi, mentre altri di basso peso molecolare possono migrare nelle sezioni o possono essere estratti dai loro nidi a seguito della fissazione. Il passo successivo è rappresentato dalla processazione del campione che consiste nella completa disidratazione ottenuta con passaggi successivi in una scala alcolica crescente e termina con il bagno del tessuto in xilolo o sostituti atossici ed inclusione in paraffina. A questo punto il campione è immerso in un blocchetto solido di paraffina che fornisce la

consistenza necessaria per procedere al sezionamento del campione con il microtomo. Le sezioni ottenute vengono fatte aderire a vetrini per permettere le successive colorazioni. L'utilizzo di vetrini rivestiti con albumina, poli-L-lisina o elettrostatici facilitano l'adesione del campione. A questo punto il preparato è pronto per essere sottoposto alle colorazioni più idonee alla finalità di analisi richiesta e per essere infine osservato al microscopio.

3.6.2 Microscopia Elettronica

La preparazione del campione per la microscopia elettronica dipende dalla natura del cibo e dal tipo di scansione o tecnica di trasmissione utilizzata. Per la SEM gli alimenti secchi sono preparati nello stesso modo delle polveri. Cibi solidi a base di proteine (formaggio, carne) sono fissati in soluzioni di glutaraldeide (1-3%, tamponata vicino al valore di pH del cibo), disidratati in etanolo, sgrassati mediante estrazione con cloroformio o n-esano, ripassati in etanolo, congelati in isopentano liquido, in azoto liquido o in slush azoto e cryofratturati. Poiché l'etanolo non forma cristalli di ghiaccio, è possibile congelare campioni impregnati in etanolo direttamente in azoto liquido. E' noto che i latticini trattati in questo modo si frammentano spontaneamente, ma ciò non si verifica se i prodotti sono congelati in isopentano o utilizzando Freon (anche se quest'ultimo è scoraggiato per l'impatto ambientale negativo). I frammenti secchi sono montati, ricoperti di oro puro o lega, ed esaminati al SEM. Se il grasso è la componente alimentare di interesse, i campioni fissati in glutaraldeide sono postfissati con una soluzione tampone di OsO₄ e la fase di estrazione del grasso viene omessa.

Campioni viscosi, che si disintegrano durante la loro preparazione, sono incapsulati in gel di agar. Le capsule sono trattate nello stesso modo dei campioni solidi. La criofratturazione fornisce immagini di qualità superiore rispetto alla fatturazione a secco.

In campioni di alimenti idratati, però, possono formarsi i cristalli durante il congelamento con conseguente formazione di artefatti. Solo un sottile strato superficiale (20 µm) è libero da tali cristalli.

Il Cryo-SEM è adatto all'analisi di cibi molto grassi e alimenti di origine vegetale, come verdure cotte, che possono andare in contro a modificazioni se sottoposti a disidratazione. Il congelamento rapido dei campioni è essenziale per la prevenzione di artefatti derivanti dalla formazione di cristalli di ghiaccio.

Il SEM a bassa tensione è utile quando applicata a campioni congelati non rivestiti perché permette l'osservazione del cibo (congelato, idratato) ad alto ingrandimento, in particolare la SEM ad emissione di campo è la più adatta per questo tipo di lavoro. Poiché i

campioni non devono essere rivestiti di metallo, possono essere fratturati in continuo nel corso dell'osservazione.

In TEM, colorazione negativa e tecniche con ombre di metallo sono adatte per macromolecole (proteine, polisaccaridi) e loro gruppi (micelle). La tecnica TEM praticata più frequentemente è l'esame di sezioni sottili. Per l'esame degli alimenti, piccoli campioni sono chimicamente fissati e inclusi in una resina come Epon, Araldite, o Spurr. Alimenti densi come il formaggio, la pasta, i prodotti a base di carne, semi, prodotti estrusi richiedono più tempo di fissazione e tempi di impregnazione maggiori rispetto agli alimenti porosi. Resine a bassa viscosità facilitano l'inclusione dei campioni.

Protocolli Separati sono stati sviluppati per la maggior parte degli alimenti. Freeze-fratturazione, freeze-etching, e la replica di platino e carbonio, seguito da TEM di repliche è la tecnica più utilizzata per l'esame di prodotti lattiero-caseari ad alto contenuto di grassi come panna, emulsioni di olio-in-acqua, come il gelato. Micrografie ottenute da qualsiasi tipo di microscopia, sono oggi registrate come immagini digitalizzate e possono essere manipolate utilizzando computer e software, che vengono incorporate nella configurazione della microscopia elettronica.

3.7 Applicazioni

3.7.1 Contaminazione del cibo

Una delle applicazioni più importanti dell'analisi microscopica degli alimenti è il rilevamento e l'identificazione di contaminanti. Per contaminanti s'intendono i corpi estranei come il metallo, gomma/plastica, solidi di vetro, legno e cristallo così come anche alcuni contaminanti biologici (ad esempio, animali o parti di insetti). Contaminanti biologici di origine microbica possono non essere rilevati in questa fase, a meno che non siano particolarmente abbondanti.

La contaminazione degli alimenti finiti può rinvenirsi a causa della cristallizzazione (ad esempio, cristalli di tirosina in pasta d'acciughe) o delle interazioni tra i componenti (ad esempio, cristalli di ossalato di calcio negli alimenti a base di latte e di componenti vegetali). A volte, invece, il cibo viene contaminato involontariamente durante la fase di elaborazione in cucina (ad esempio, da un vetro o particelle di smalto da utensili da cucina) o anche durante il consumo (ad esempio, i chip di smalto dei denti e otturazioni).

Molti dei casi di contaminazione degli alimenti possono risolversi con l'aiuto di microanalisi elementare del campione. Solitamente queste indagini vengono effettuate a seguito di un reclamo del consumatore.

3.7.2 Analisi strutturale

La microstruttura del cibo è strettamente legata alle sue proprietà sensoriali, ad esempio, l'elasticità, la fermezza, la morbidezza e la succosità. Proteine e carboidrati formano gel, la cui struttura influenza la proprietà di conservazione dell'acqua e del grasso. Le strutture gelatinose di diversi biopolimeri (ad esempio, glutine, miosina, amido, glicogeno) sono state studiate approfonditamente. Grassi e oli, le loro forme cristalline, emulsioni, schiume, rappresentano un altro importante ambito di studi di struttura alimentare in cui vengono utilizzati tutti i tipi di microscopia. I risultati ottenuti dall'analisi di cibi tradizionali possono essere applicati agli alimenti di nuova formulazione per migliorare il loro impatto sul consumatore.

3.7.2.1 Carne

Il componente base della carne è il tessuto muscolare, che ha una microstruttura complessa. Le miofibre sono circondate da membrane di tessuto connettivo (endomysio) e pacchi di miofibre sono separate l'una dall'altra da un'altra membrana di tessuto connettivo (perimysio). Il muscolo contiene anche le vene, le arterie e le fibre nervose.

La microscopia viene utilizzata per analizzare i cambiamenti che si verificano nelle strutture muscolari dopo che l'animale è stato macellato, durante il *rigor mortis* e poi durante la maturazione, la refrigerazione, l'eventuale congelamento, la salatura e la lavorazione della carne. Questi processi causano modifiche alla microstruttura muscolare, ma i cambiamenti più significativi sono causati dal riscaldamento, che denatura le proteine, porta alla contrazione delle fibre muscolari, e alla perdita della struttura. Tali cambiamenti possono essere osservati con tecniche sia di microscopia ottica che elettronica.

I singoli componenti della carne cruda, della carne riscaldata e della carne cotta possono essere rilevati utilizzando anticorpi specifici per antigeni strutturali in combinazione con la microscopia a fluorescenza.

Prodotti a base di carne costituiti da più componenti di solito sono chiamati emulsioni di carne. Il legame delle particelle di carne e grasso è migliorato dall'ausilio di particelle munite da cariche tra le quali annoveriamo farine di soia o grano, caseinato di sodio, amido, glutine, e altri polisaccaridi e proteine. Il loro ruolo è quello di aumentare il rendimento del prodotto, migliorare la stabilità, e modificarne le proprietà. La microscopia è usata per rilevarne la presenza, determinarne la quantità, e stabilire la loro distribuzione.

3.7.2.2 Prodotti lattiero-caseari

La maggior parte dei prodotti lattiero caseari, yogurt e formaggi, sono costituiti da micelle di caseina e proteine del siero coagulate. Per l'analisi di questi costituenti devono essere utilizzate tecniche di microscopia elettronica perché le tecniche di microscopia ottica non forniscono una risoluzione sufficiente.

La coagulazione del latte si traduce nella formazione di due gel diversi secondo la temperatura cui è sottoposto il prodotto. Il riscaldamento provoca interazioni tra k-caseina, caseina presente sulla superficie delle micelle, e una proteina del siero chiamata b-lattoglobulina. La proteina complessa risultante occupa siti idonei per l'interazione con le micelle e il gel derivante consiste di piccole catene intrecciate e minuscoli pori in cui la fase liquida è saldamente immobilizzata.

Questa struttura che conserva saldamente la fase liquida è importante per i prodotti lattiero caseari morbidi come lo yogurt. Clusters proteici grandi si sviluppano in coaguli nel latte riscaldato ad alte temperature e causano sineresi del gel cioè, la separazione della fase liquida chiamata siero. Queste strutture sono importanti nella produzione del formaggio.

L'identificazione di componenti alimentari specifici come proteine e polisaccaridi è possibile in microscopia ottica utilizzando l'immunolocalizzazione con anticorpi marcati.

La SEM viene utilizzata invece per analizzare i cristalli di sale nei formaggi e i depositi di muffe superficiali in formaggi come il Camembert.

L'esame Cryo-SEM o TEM di prodotti come la panna montata permette la visualizzazione delle celle d'aria e dei globuli di grasso che aderiscono all' interfaccia aria-liquido. La Distribuzione dei globuli di grasso e delle gocce d'acqua intatte nel burro e in altre emulsioni è anche adeguatamente studiata con queste tecniche in cui il campione è preparato mediante fissazione per congelamento rapido.

3.7.2.3 Cibi di origine vegetale

Questo gruppo di alimenti è vario, e comprende farine di grano, pasta, prodotti da forno, prodotti derivati da amido e/o di proteine vegetali, frutta e verdura. La consistenza di queste gamme di alimenti varia da liquidi (succhi di frutta e di verdura, birra, vino) a alimenti umidi (pane, patate al forno, tofu) a prodotti a basso tenore di umidità (patatine, pane grattugiato).

Tutti questi prodotti sono derivati da cellule vegetali, le pareti delle quali sono costituite da cellulosa, emicellulose, lignina, pectine e proteine. I cibi di origine vegetale sono spesso preparati attraverso la cottura e/o il congelamento e possono essere analizzati con tecniche di microscopia ottica ed elettronica. In contrasto, gli alimenti estrusi sono prodotti

con un processo complesso in cui si susseguono alta temperatura, alta pressione e taglio meccanico. Il prodotto risultante è poroso, nonché compatto ed è difficile da incorporare in resina e sezionare per microscopia ottica ed elettronica; pertanto la SEM è la tecnica più utilizzata per analizzare questa categoria di alimenti.

Rispetto ai prodotti a base di carne e i lattiero caseari, molti alimenti vegetali contengono poche proteine.

3.8 Evoluzione nell'analisi microscopica degli alimenti

Negli ultimi anni, sono stati compiuti progressi significativi nell'analisi microscopica delle strutture alimentari. Questi progressi sono stati determinati in parte dallo sviluppo di nuove tecniche e dalla loro applicazione per la risoluzione dei problemi tradizionali, inoltre l'applicazione di analisi d'immagini ha svolto un ruolo importante e si pone come una componente essenziale di analisi alimentare quantitativa.

Due degli sviluppi più importanti sono il crescente utilizzo di laser per microscopia confocale a scansione (AFM) nell'analisi della microstruttura del cibo. Per esempio, l'AFM è stato utilizzato per studiare la struttura di grassi e oli, e ha fornito la prova convincente per la presenza di microreti entro tali sostanze. Questo è stato possibile grazie ad una recente innovazione nella tecnologia AFM, conosciuta come il modo maschiatura, in cui viene fatto oscillare il cantilever collegato alla stilo durante la scansione della superficie del campione, permettendo all'AFM di essere utilizzato con materiali alimentari morbidi e idratati. Un altro esempio è l'uso di CLSM utilizzato ad esempio per studiare l'impatto della frittura ad olio su fettine di patate. La capacità di generare sezioni ottiche non distruttive del campione ha facilitato l'individuazione della penetrazione dell'olio nella crosta, seguito dalle ricostruzioni tridimensionali che mostravano l'olio intorno alle cellule e penetrato nel cibo attraverso spazi intercellulari, mentre non è stato rilevato all'interno delle cellule.

4. Tecniche di microscopia per lo studio di prodotti ittici

4.1 Microscopia ottica

La microstruttura dei cibi costituisce un legame tra livello molecolare e macroscopico e costituisce un fattore chiave per lo studio delle proprietà degli alimenti e per il miglioramento e l'ottimizzazione dei processi alimentari. L'organizzazione strutturale dei componenti chimici degli alimenti (proteine, carboidrati, grassi, ecc) è responsabile della stessa microstruttura, infatti qualsiasi modifica chimica o enzimatica che avviene nei componenti ha un effetto sull'organizzazione microstrutturale delle matrici alimentari e sulla loro funzionalità.

Diverse metodiche possono essere utilizzate per studiare la microstruttura dei cibi e Perez-Munuera (2008) hanno fornito una panoramica delle tecniche più importanti per lo studio della struttura degli alimenti soprattutto di quelli ittici.

Il microscopio ottico (MO), strumento base per tale analisi, è uno strumento molto versatile che, come già detto, può essere impiegato con diverse metodiche come ad esempio in campo chiaro, contrasto di fase e contrasto interferenziale differenziale, microscopia polarizzata o microscopia a fluorescenza. L'applicazione più utile per studiare la struttura di cibi a base di pesce è la microscopia in campo chiaro.

4.1.1 Preparazione del campione per MO

Per sottoporre il campione ad analisi microscopica strutturale lo stesso deve prima di tutto essere preparato. I passi standard sono: fissazione, disidratazione, inclusione e taglio.

La fissazione serve a preservare il tessuto ed avviene immergendolo in soluzioni fissative per un tempo idoneo alla penetrazione del liquido nel tessuto; la disidratazione avviene con passaggi successivi in una scala alcoolica crescente; l'inclusione avviene immergendo il tessuto in paraffina. Quest'ultima fase permette l'orientamento del campione in un "blocco" di paraffina che può essere facilmente sezionato utilizzando un microtomo per produrre sezioni molto sottili. Una volta che le sezioni semifini sono ottenute vengono adese su vetrini portaoggetto e colorate con coloranti diversi (blu di toluidina, sudan, olio rosso, iodio, verde chiaro, ecc) prima dell'esame microscopico.

4.2 Microscopia elettronica

La microscopia elettronica (EM) consente che le strutture alimentari siano studiate a ingrandimenti maggiori rispetto a quelli utilizzati in MO. Esistono due tipi di microscopi che utilizzano fasci di elettroni come fonte di illuminazione: microscopi elettronici a trasmissione (TEM) e microscopi a scansione elettronica (SEM). In entrambi i metodi, i campioni devono essere prima preparati.

I passaggi di preparazione dei campioni per l'osservazione TEM sono fissazione primaria con aldeidi quali glutaraldeide, ancoraggio secondario con tetrossido di osmio, disidratazione in una serie di diluizioni di etanolo a concentrazioni crescenti, infiltrazione e l'inclusione in resina, taglio di sezioni ultrasottili (5-100 nm) con un ultramicrotomo, e colorazione delle sezioni ultrasottili con soluzioni di metalli pesanti come citrato di piombo o acetato di uranile.

Il metodo SEM osserva la superficie del campione, quindi non c'è bisogno di sezionarlo. Ci sono due modi di preparazione dei campioni per SEM: fissazione chimica e fissazione fisica.

Nel primo, la procedura di preparazione del campione prevede fissazione chimica (con aldeidi e tetrossido di osmio, come per TEM), disidratazione in una serie di diluizioni di etanolo a concentrazioni crescenti, essiccazione fino ad un punto critico, e rivestimento con un metallo conduttore per SEM imaging o con carbone per x-ray. Quando viene usata la fissazione fisica, il campione viene congelato in azoto liquido e poi liofilizzato prima di essere rivestito e osservato. Negli ultimi anni, notevoli progressi sono stati compiuti nel campo della SEM attraverso tecniche di vetrifica. In Cryo-SEM, il campione viene congelato in azoto slush e velocemente posto sotto vuoto, raffreddato e posto su un microscopio in cui è fratturato, inciso, rivestito, e osservato, in questo modo, il campione può essere osservato con tutta l'acqua costituente. Oltre gli elettroni secondari, emanazioni o altri segnali, quali i raggi X, elettroni retrodiffusi, e così via, possono essere generati dal fascio elettronico che colpisce il campione. Questi segnali differenti possono essere catturati dal rilevatore appropriato in ciascun caso. In questo modo, gli ioni o le molecole possono essere identificati e quantificati in situ utilizzando rivelatori specifici accoppiati al microscopio elettronico, in tal modo la microanalisi può essere effettuata per mezzo di x-ray. Infine, l'analisi delle immagini si basa molto sulla tecnologia del computer per ottenere risultati quantitativi di osservazione al microscopio.

5. Anatomia muscolare e funzione

L'anatomia del muscolo del pesce è diversa dall'anatomia dei muscoli dei mammiferi terrestri, infatti, nel pesce manca il sistema tendineo di collegamento tra i fasci muscolari e lo scheletro dell'animale. Invece, il pesce ha cellule muscolari parallele e collegate con guaine di tessuto connettivo, che sono ancorate allo scheletro e alla pelle. I fasci di cellule muscolari parallele sono chiamati miotomi (Figura 1).

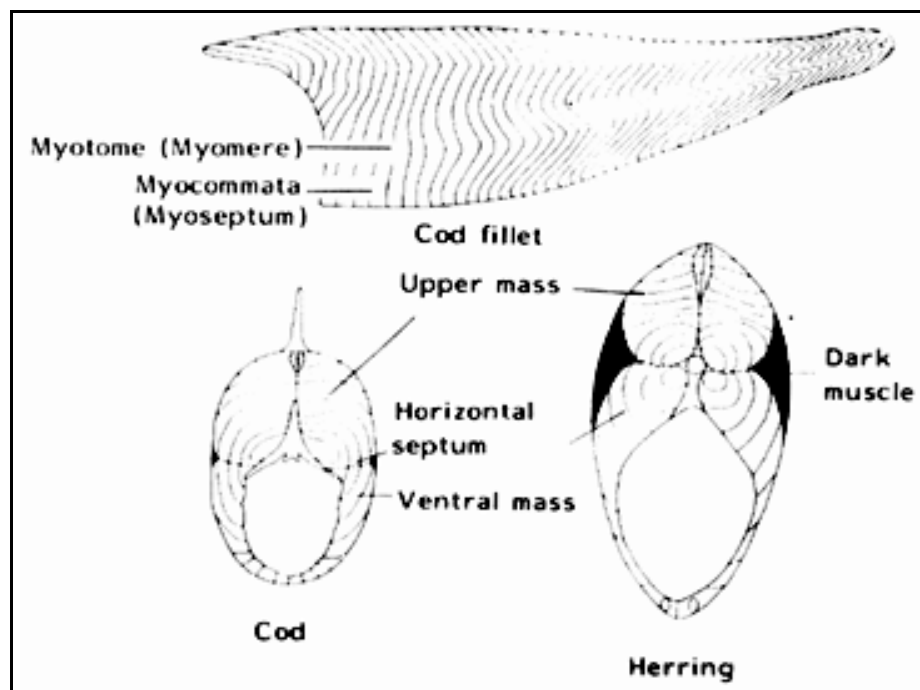


Figura 1: Muscolatura scheletrica del pesce (da Knorr, 1974)

Tutte le cellule muscolari si stendono lungo tutta la lunghezza tra due myocommata, e corrono parallele alla direzione longitudinale del pesce. Le masse muscolari presenti su ciascun lato del pesce formano il filetto che è costituito nella parte superiore dal muscolo dorsale e nella parte inferiore dal muscolo ventrale. Il filetto è eterogeneo perché la lunghezza delle cellule muscolari varia dall'estremità della testa alla coda. Anche il diametro delle cellule varia, essendo più largo nella parte ventrale del filetto.

I myommata corrono in maniera obliqua, quasi con schema simile a quello di un aratro perpendicolare all'asse lungo del pesce, dalla pelle alla colonna vertebrale. Questa struttura

anatomica è ideale per i movimenti muscolari di flessione necessari alla propulsione del pesce nell'acqua.

Come nei mammiferi, il tessuto muscolare di pesce è composto di muscoli striati. L'unità funzionale, cioè la cellula muscolare, è costituita da sarcoplasma contenente i nuclei, grani di glicogeno, mitocondri, ecc, e una serie (fino a 1000) di miofibrille. La cellula è circondata da una guaina di tessuto connettivo chiamata sarcolemma. Le miofibrille contengono le proteine contrattili, actina e miosina. Queste proteine o filamenti sono disposte alternate facendo apparire il muscolo striato all'esame microscopico (Figura 2)

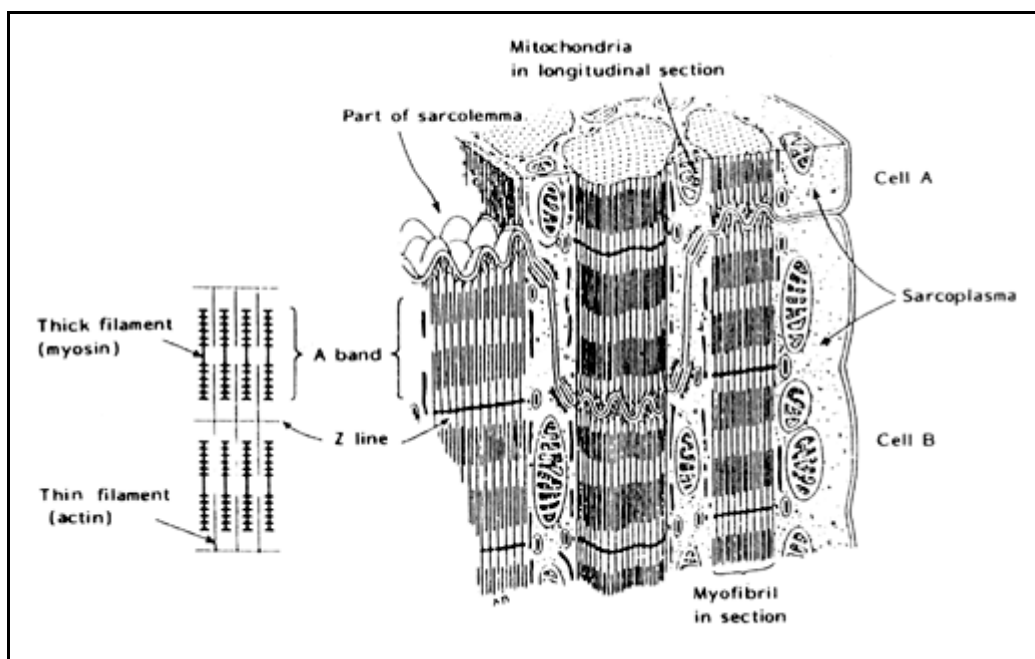


Figura 2: Sezione di una cellula mostrante diverse strutture tra cui le miofibrille (da Bell *et al.*, 1976).

La maggior parte del tessuto muscolare di pesce è bianco, ma, a seconda della specie, alcuni pesci possono avere una certa quantità di tessuto muscolare scuro di colore marrone o rossastro. Il muscolo scuro si trova sotto la pelle lungo il lato del corpo. La proporzione di muscolo scuro varia con l'attività del pesce. Nei pesci pelagici, cioè, specie come aringhe e sgombri che nuotano nelle acque più o meno di continuo, fino al 48% del peso corporeo può essere costituito da muscolo scuro (Love, 1970). Nei pesci demersali, vale a dire, le specie che si nutrono sul fondo e solo periodicamente si spostano, la quantità di muscolo scuro è molto bassa.

Ci sono molte differenze nella composizione chimica dei due tipi muscolari, tra le più notevoli si rilevano più elevati livelli di lipidi e mioglobina nel muscolo scuro.

Da un punto di vista tecnologico, l'alto contenuto di lipidi del muscolo scuro è importante poiché è causa di problemi d'irrancidimento del prodotto finale.

Il colore della carne rossastra tipica dei salmoni e delle trote di mare non origina dalla mioglobina, ma è dovuto ad un carotenoide rosso, l'astaxantina. La funzione di questo pigmento non è stata chiaramente stabilita, ma è stato ipotizzato che il carotenoide possa giocare un ruolo come antiossidante. Inoltre, l'accumulo nel muscolo può funzionare come un deposito di pigmento necessario al momento della riproduzione quando il maschio sviluppa un colore rosso intenso nella pelle. Si vede chiaramente che il colore del muscolo svanisce nei salmonidi al momento della deposizione delle uova. Il pesce non è in grado di sintetizzare l'astaxantina e la presenza del pigmento dipende quindi dall'ingestione attraverso il cibo. Alcuni salmonidi vivono in acque dove la preda naturale non contiene molti carotenoidi, ad esempio, nel Mar Baltico, con il risultato di un colore rosso muscolare meno intenso dei salmonidi di altre acque. Quest'evidenza può essere considerata come un'indicazione che la funzione fisiologica dell'astaxantina può essere irrilevante.

La contrazione muscolare inizia quando un impulso nervoso scatena un rilascio di Ca^{++} dal reticolo sarcoplasmatico alle miofibrille. Quando aumenta la concentrazione di Ca^{++} nel sito attivo dell'enzima sul filamento miosina, l'enzima ATP-asi viene attivato. Questo ATP-asi divide l'ATP trovato tra i filamenti di actina e miosina, provocando il rilascio di energia. La maggior parte di questa energia è utilizzata come energia contrattile che fa scorrere i filamenti di actina tra i filamenti di miosina in modo telescopico, così da contrarre la fibra muscolare. Quando la reazione è inversa (cioè, quando il Ca^{++} viene pompato, il contrattile ATP-asi attività si ferma ed i filamenti possono scivolare passivamente), il muscolo è rilassato.

La fonte di energia per la produzione di ATP nel muscolo chiaro è il glicogeno, mentre il muscolo scuro può anche usare lipidi. Una differenza importante è, inoltre, che il muscolo scuro contiene più mitocondri del muscolo chiaro, che gli permettono di operare un intenso metabolismo energetico aerobico con conseguente liberazione di CO_2 e H_2O come prodotti finali. Il muscolo chiaro, generando energia prevalentemente dal metabolismo anaerobico, accumula acido lattico che deve essere trasportato al fegato per la successiva metabolizzazione.

I modelli metabolici diversi che si trovano nei due tipi di muscoli rendono il muscolo chiaro ottimamente attrezzato per forti contrazioni muscolari brevi, mentre il muscolo scuro progettato per contrazione continua, anche se i movimenti muscolari non sono così forti.

Le funzioni biochimiche e fisiologiche di regolazione che operano *in vivo* cessano dopo la morte, e le risorse energetiche dei muscoli si esauriscono. Quando il livello di ATP raggiunge il minimo, actina e miosina sono si legano irreversibile, con conseguente *rigor mortis*.

5.1 Microstruttura

La maggior parte dei prodotti ittici commestibili sono derivati dai muscoli scheletrici, che rappresentano oltre il 50 per cento della massa totale del corpo di questi animali.

I muscoli scheletrici dei pesci sono composti per lo più da fibre a contrazione rapida di colore bianco. L'alta percentuale di fibre bianche permette ai pesci di nuotare con improvvisi movimenti rapidi e conferisce al tessuto edibile il suo colore bianco. Queste fibre metabolizzano principalmente glucosio, uno zucchero semplice rilasciato dal glicogeno muscolare, per la produzione di energia attraverso glicolisi anaerobica (cioè in assenza di ossigeno). Pertanto, le fibre bianche contengono relativamente poca mioglobina, proteina che lega l'ossigeno e che fornisce il colore rosso ai muscoli in altri animali.

Il muscolo di pesce è composto da miotomi. Essi sono disposti in cerchi concentrici che formano le suddivisioni dei muscoli striati (Figura 3). Ad ogni suddivisione ci sono macroscopiche linee di divisione (myocommata collagene). Le cellule muscolari sono corte e con diametro 0,02-1,0 mm. Esse sono circondate da una membrana detta sarcolemma e da un sottile strato di tessuto connettivo (endomisio).

Molti endomisi sono collegati al perimisio, che è contiguo alla myocommata (Ofstad *et al.*, 2006). Le fibre sono sostanzialmente uguali a quelle degli animali terrestri in termini di disposizione dei filamenti spessi e sottili, mostrando disposizioni alternate di bande A e I (Perez-Munuera *et al.*, 2008), ma il contenuto di collagene totale è inferiore, poiché l'acqua in cui il pesce vive presta supporto per il corpo (Lampila *et al.*, 1990).

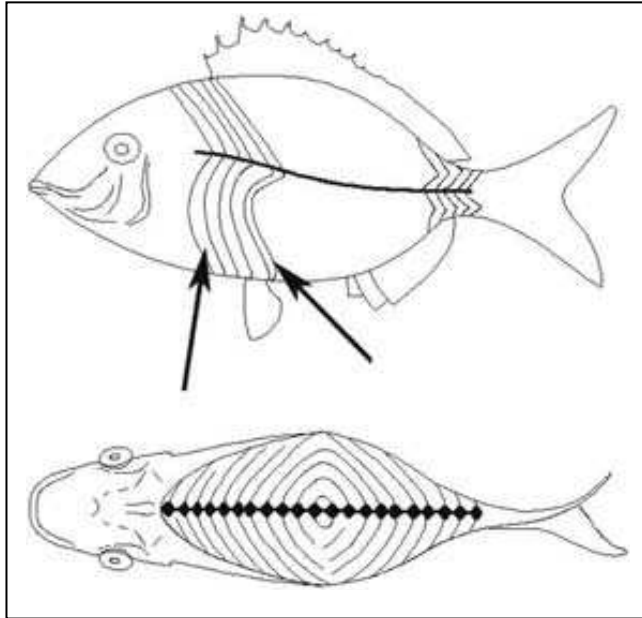


Figura 3: miotomi disposti in cerchi concentrici che formano le suddivisioni dei muscoli striati (da Ofstad *et al.*, 2006).

6. Differenziazione di pesce fresco e surgelato- scongelato

6.1 Introduzione

L'autenticità del prodotto è un settore di emergente interesse nel campo alimentare. In questo ambito prodotti come il pesce, dotati di rapida deperibilità, spesso sono sottoposti a pratiche tecnologiche per estenderne la durata di conservazione. Tuttavia, il pesce congelato di solito ha un prezzo di mercato molto inferiore a quello fresco, per cui la fraudolenta vendita di prodotti congelati-scongelati per freschi rappresenta una problematica di autenticità di elevato interesse. Secondo le norme dell'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) l'etichettatura deve indicare che il pesce è stato congelato e non deve essere ricongelato, e pesci congelati-scongelati devono essere etichettati come precedentemente congelati (FAO 1982; JAS 2000). Queste norme sono state recepite e divenute requisiti normativi in molti paesi.

E' generalmente accettato che il pesce fresco (o filetti / porzioni da esso derivato) e il pesce congelato-scongelato sono tipi di prodotti che dovrebbero essere differenziati (Rehbein *et al.*, 1992). Il pesce fresco è, infatti, inteso come pesce appena pescato o che è stato raffreddato e conservato per un breve periodo a temperatura di refrigerazione prima di essere acquistato o utilizzato. Per un periodo di stoccaggio più lungo è normalmente utilizzato il congelamento. Tuttavia, mentre la congelazione è efficace nella protezione del tessuto muscolare del pesce contro il deterioramento microbiologico, ed, in certa misura, chimico, il suo stato fisico e le sue proprietà organolettiche non vengono totalmente conservate (Uddin *et al.*, 2004). La percezione del consumatore è inferiore a quella ottenuta dal pesce fresco e questo giustifica il prezzo che realizza. In pratica, un numero considerevole di prodotti congelati sono scongelati nei negozi, conservati nel ghiaccio, e venduti scongelati senza essere etichettati come tali. Per la tutela del consumatore e per repressione nei confronti della concorrenza sleale nel commercio è auspicabile una corretta etichettatura dei prodotti congelati-scongelati.

Il congelamento è uno dei principali processi attualmente utilizzati per estendere la durata di conservazione del pesce perché inibisce la crescita microbica e riduce il deterioramento biochimico e fisico del prodotto durante la conservazione. Ma il congelamento può alterare la qualità dei prodotti. I cambiamenti fisici e chimici nelle proteine che si verificano durante la conservazione congelata può causare un peggioramento della struttura,

che ha effetti negativi sulle proprietà funzionali, nutrizionali e sensoriali del pesce. Inoltre, l'ossidazione dei lipidi durante lo stoccaggio a lungo termine può portare all'insorgenza del sapore rancido. Tuttavia, quando il congelamento, la conservazione e lo scongelamento vengono eseguiti correttamente, le proprietà organolettiche del prodotto sono molto simili a quelle del prodotto fresco.

Molti consumatori non notano i cambiamenti che si verificano nel pesce congelato, ma preferiscono il pesce fresco nonostante il suo costo più elevato. Per questo motivo, l'autenticazione del pesce fresco è importante per il consumatore, perché la sostituzione dei prodotti congelati, decongelati per freschi si configura come una pratica fraudolenta frequente. Purtroppo, però, non è facile distinguere tra un pesce scongelato e uno fresco, perché le loro caratteristiche fisiche e chimiche sono molto simili. Ad oggi numerose forze sono state impiegate per l'elaborazione di metodi in grado di stabilire se un pesce è stato precedentemente congelato (Duflos *et al.*, 2002). Il controllo di etichettatura è infatti possibile solo se esistono metodi rapidi e affidabili di indagine che consentono alle autorità di controllo degli alimenti di distinguere tra il prodotto fresco, congelato e scongelato. Di seguito viene riportata una sintesi dei metodi sviluppati per differenziare pesce fresco e scongelato

6.2 Esame dell'opacità del cristallino dell'occhio

Il primo metodo utilizzato da Love (Love, 1956) per distinguere tra matrice fresca e congelata consiste nell'analisi della lente dell'occhio. La lente dell'occhio dei pesci è costituita da una parte centrale detta midollare e da uno strato esterno detto corteccia. La midollare del pesce fresco è trasparente, ma il congelamento la opacizza (Love, 1956) (Figura 4). Yoshioka e Kitamikado (1983) hanno però evidenziato che non in tutte le specie avveniva questo cambiamento: infatti la midollare di qualche sugarello (9 su 112) diviene opaca dopo 7 giorni di conservazione in ghiaccio in un locale freddo (Okazaki *et al.*, 2006).

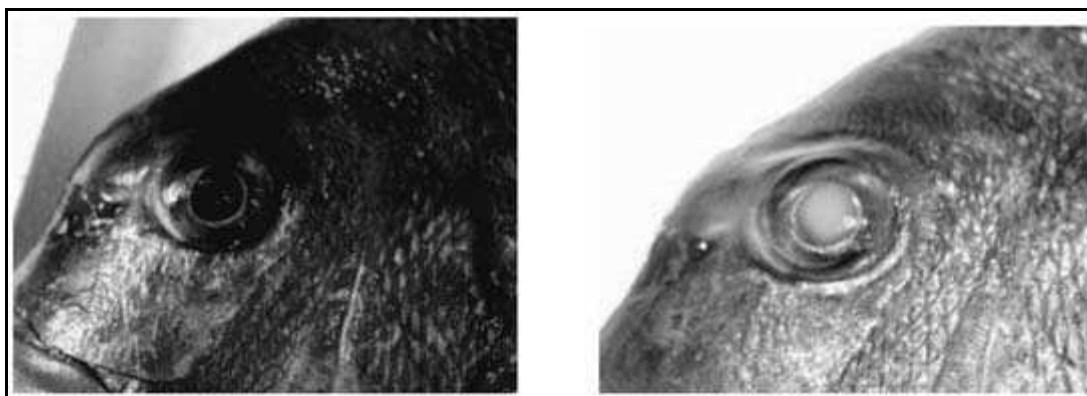


Figura 4: Midollare trasparente e opaca di orata fresca (A) e scongelata (B).

6.3 Misurazione della resistenza elettrica

Altra metodica ampiamente utilizzata per valutare la freschezza del pesce è la misurazione della resistenza elettrica (Duflos *et al.*, 2002; Sakaguchi *et al.*, 1989). Infatti con il progredire del deterioramento del pesce la resistenza elettrica dei tessuti (pelle, muscolo) diminuisce costantemente poiché vengono danneggiate le membrane cellulari. Inoltre le membrane vengono distrutte anche durante le procedure di congelamento e scongelamento, la resistenza elettrica del pesce scongelato appare alterata (Rehbein *et al.*, 1992). Per questo scopo possono essere utilizzati due strumenti: il Torrymeter (Figura 5) e il Fish-Tester. Entrambi hanno scale di lettura differenti (Torrymeter: 0-16; Fish-Tester: 0-100), ma per entrambi gli strumenti le letture sono correlate positivamente con la freschezza, cioè, valori alti indicano l'alta qualità mentre il pesce scongelato è caratterizzato da valori vicini allo zero. Il Torrymeter è stato utilizzato con successo per differenziare pesci freschi e congelati-scongelati (Duflos *et al.*, 2002; Okazaki *et al.*, 2003). Duflos *et al.* (2002) ha valutato l'efficacia del Torrymeter per classificare pesci freschi e congelati-scongelati utilizzando tre specie: passera di mare (*Pleuronectes platessa*), merlano (*Merlangus merlangus*), e lo sgombero (*Scomber scombrus*), confrontando i risultati ottenuti a seguito di congelamento lento e rapido e studiato come il deterioramento influisce sulle misure. I valori medi di 60 misurazioni per i pesci congelati rapidamente o lentamente erano vicini allo zero e sono stati significativamente inferiori ($p < 0.01$) rispetto a quelli freschi. Una più piccola ma comunque significativa differenza è stata osservata tra filetti freschi e decongelati ($p < 0.01$). C'erano però differenze tra i valori rilevati sul lato viscerale e sulla pelle dei filetti. Valori che per filetti freschi erano inferiori a quelli per pesce fresco intero, mentre i valori dei filetti congelati sono risultati superiori rispetto a tutti quelli dei pesci.

Lo studio ha rivelato che il Torrymeter è un indicatore affidabile per i pesci e non per i filetti cos' come riportato anche da uno studio successivo (Okazaki *et al.*, 2003). Tuttavia, l'inconveniente di utilizzare il Torrymeter è che questo strumento non può essere applicato su specie di mare in cui vi sia elevato contenuto di sale (Rehbein *et al.*, 1992; Okazaki *et al.*, 2003).



Figura 5: Lettura con il Torrymeter di orata.

6.4 Determinazione del valore di ematocrito ed esame degli eritrociti

Entrambi questi metodi si basano sulle modificazioni dei globuli rossi a seguito di congelamento e scongelamento. Ovviamente è molto difficile da applicare su pesci e filetti in cui vi sono solo minime quantità di sangue o di muscoli rosso, come ad esempio, filetti di merluzzo. Il valore di ematocrito è definito come la percentuale degli eritrociti rispetto al volume ematico; è espresso come percentuale e determinato mediante centrifugazione del

sangue. Il valore di ematocrito di pesci congelati-scongelati (carpa, occhione, sgombero, tonno giallo e palamita) è stato determinato pari a zero, mentre il pesce fresco ha dato valori compresi tra 21% e 48%, a seconda della freschezza e della specie (Yoshioka *et al.*, 1983; Uddin *et al.*, 2003).

Yoshioka e Kitamikado (Yoshioka *et al.*, 1988) hanno valutato l'esame microscopico degli eritrociti per differenziare pesce fresco e congelato. Hanno prelevato una piccola quantità di sangue dall'aorta centrale o dorsale di filetti e da sgombri, spalmato su un vetrino, asciugato, colorato con soluzione di Giemsa, e esaminati microscopicamente. Inoltre, una piccola quantità di muscolo rosso superficiale è stata presa dai campioni e trattati come descritto sopra. Tutti gli eritrociti erano distrutti in campioni congelati e scongelati, mentre erano intatti in campioni freschi e refrigerati. Lo stesso metodo è stato anche applicato con successo su filetti commerciali (Yamashita *et al.*, 2003).

6.5 Metodi enzimatici

Tra le tecniche sviluppate per differenziare tra pesci e filetti freschi e congelati-scongelati i saggi enzimatici sono ampiamente studiati. Le cellule muscolari e i loro organelli vengono distrutti dal congelamento e scongelamento (Rehbein *et al.*, 1979; Uddin *et al.*, 2004) con conseguente liberazione degli enzimi (Rehbein *et al.*, 1979; Yuan *et al.*, 1988).

Quando il muscolo di pesce fresco viene estratto con cura con soluzione isotonica (0,25-0,30 M saccarosio), sono rilevabili solo bassa attività di enzimi lisosomiali e mitocondriali nella frazione solubile (surnatante), lo stesso trattamento applicato a muscoli congelati-scongelati rileva attività notevolmente aumentate (Karvinen *et al.*, 1982). I metodi enzimatici hanno inoltre valutato gli enzimi mitocondriali (β -idrossiacil-CoA deidrogenasi o HADH (Gottesmann *et al.*, 1983; Fernandez *et al.*, 1999), L-malato-NADP-ossidoreduttasi o enzima malico (Gould *et al.*, 1970), aspartato-aminotransferasi (Chatbar *et al.*, 1977), ossalacetato transaminasi glutammato (Salfi *et al.*, 1985), AMP deaminasi lipoamide-reduttasi e 5' (Damodaran *et al.*, 1990), lattato deidrogenasi (Rehbein *et al.*, 1979; Damodaran *et al.*, 1990), citocromo C ossidasi (Karvinen *et al.*, 1982; Barbagli *et al.*, 1982), succinato deidrogenasi (Frigerio *et al.*, 1980), fumarasi e glutammato deidrogenasi (Rehbein *et al.*, 1979), L-malato-deidrogenasi (Salfi *et al.*, 1986), enzimi estratti da cellule del sangue β -N-acetilglucosaminidasi (Yuan *et al.*, 1988; Kitamikado *et al.*, 1988) e gli enzimi lisosomiali (α -glucosidasi e β -N-acetilglucosaminidasi (Rehbein *et al.*, 1978; Rehbein *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1993), acido fosfatasi (Rehbein *et al.*, 1978; Rehbein *et al.*, 1979), β -galattosidasi e β -glucuronidasi (Rehbein *et al.*, 1979). Il congelamento provoca la perdita di tali enzimi negli

essudati e quindi un aumento dell'attività enzimatica del tessuto che può essere misurata. I migliori risultati sono ottenuti mediante saggi spettrofotometrici per α -glucosidasi, β -N-acetilglucosaminidasi, e HADH, da saggi fluorimetrici per β -N-acetilglucosaminidasi di sangue, e da misurazioni elettroforetiche di glutammato ossalacetato transaminasi e enzima malico. Il vantaggio dei metodi enzimatici risiede nel fatto che essi sono applicabili a filetti e pesci.

Da queste numerose tecniche enzimatiche, Duflos et al. (Duflos *et al.*, 2002) ha rivalutato tre saggi enzimatici selezionati (α -glucosidasi, β -N-acetilglucosaminidasi, e HADH) per classificare pesci e filetti freschi e congelati-scongelati. Tre specie sono state utilizzate nello studio: la passera di mare (*P. platessa*), il merlano (*M. merlangus*), e lo sgombrò (*S. scombrus*). Un lotto omogeneo di ciascuna specie è stato conservato a 0°C in ghiaccio o a -20°C con congelamento lento o congelamento rapido in una cella. Tutti i campioni sono stati analizzati dopo 24 ore a temperatura di congelamento. L'effetto specie è abbastanza notevole, ed è stato difficile definire un valore di cut-off per ciascuna specie.

Il test della β -N-acetilglucosaminidasi non è risultato utile per caratterizzare il processo di congelamento, in quanto la differenza è stata insufficiente per distinguere inequivocabilmente tra i campioni freschi e congelati-scongelati. In tutte e tre le specie questo enzima sembra poco adatto per stabilire lo stato di conservazione.

L'attività HADH in tutte e tre le specie differiva sostanzialmente tra pesce fresco e surgelato (test t di Student, $p < 0,05$). Le deviazioni standard però, erano grandi, soprattutto per i pesci congelati. L'analisi dei risultati di passera è stata facilitata da valori molto bassi riscontrati per i campioni freschi. Di queste attività enzimatiche, quella del HADH e l' α -glucosidasi erano indicativi per l'identificazione del pesce congelato.

6.6 Analisi spettroscopica

La spettroscopia è un potentissimo metodo di indagine della struttura della materia che si basa sull'analisi della scomposizione della luce da questa emessa nelle sue lunghezze d'onda fondamentali. La scomposizione della luce nelle lunghezze d'onda componenti, ottenuta col passaggio attraverso un elemento dispersivo quale un prisma o un reticolo di diffrazione, costituisce lo spettro, ovvero l'impronta digitale della sorgente luminosa, che ne identifica inequivocabilmente la natura chimica e le condizioni fisiche in cui si trova.

I recenti sviluppi delle tecniche spettroscopiche fa sì che queste tecniche vengano impiegate anche per differenziare pesci freschi e congelati-scongelati (Foucat *et al.*, 2001; Uddin *et al.*, 2008). La spettroscopia a fluorescenza Front-face combinata con strumenti

chemiometrici è stata indagata (Karoui *et al.*, 2006) come una tecnica rapida per differenziare pesce fresco da quello congelato-scongelato. Per i campioni congelati, scongelati, sono state indagate due velocità di congelamento e scongelamento (veloce e lento). Sui campioni sono stati valutati gli spettri di emissione di triptofano (eccitazione: 290 nm, emissione: 305-400 nm) e nicotinammide adenin dinucleotide (NADH) (eccitazione: 340 nm, emissione: 360-570 nm). Gli spettri di NADH hanno dato buoni risultati di discriminazione tra pesci freschi e congelati-scongelati rispetto a quelli degli spettri di triptofano. Gli spettri di NADH possono essere considerati come una sonda promettente per la differenziazione affidabile tra pesce congelato-scongelato.

6.7 La risonanza magnetica nucleare (NMR)

La Risonanza Magnetica Nucleare (RMN o, raramente, RNM), in inglese Nuclear Magnetic Resonance (NMR), è una tecnica di indagine sulla materia basata sulla misura della precessione dello spin di protoni o di altri nuclei dotati di momento magnetico quando sono sottoposti ad un campo magnetico.

Si è studiata la risonanza magnetica nucleare (NMR) combinata con lo studio istologico (Foucat *et al.*, 2001). I risultati riportati in questo studio hanno dimostrato che la risonanza magnetica per immagini (MRI) fornisce misurazioni dei parametri che sono sempre affidabili e riproducibili inoltre che le variazioni dei parametri NMR sono in accordo con le osservazioni istologiche e consentono la caratterizzazione dei cambiamenti strutturali nel tessuto indotto dal processo di congelamento. La tecnica NMR ha dimostrato che la maggior parte dei danni si verificano al momento del congelamento.

6.8 Microscopia NIR

La spettroscopia NIR è una metodica analitica di tipo fisico basata sull'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche caratterizzate nella zona del vicino infrarosso da numeri d'onda tra 12800 e 4000 cm⁻¹ (780-2500 nm). Il segnale analitico che si ottiene dipende dalle proprietà chimico-fisiche del campione che durante l'analisi viene colpito da radiazioni incidenti, le quali possono essere assorbite, in parte trasmesse ed in parte riflesse. Lo spettro ottenuto, ponendo l'intensità dell'assorbimento in funzione dei numeri d'onda, è caratterizzato da picchi riferibili a gruppi funzionali specifici presenti nel campione. Ne risulta che la spettroscopia NIR è una tecnica analitica molto efficace per determinare in tempi ridotti e in modo simultaneo numerose proprietà dei prodotti

Le tecniche fino ad ora passate in rassegna permettono di differenziare pesci freschi e congelati-scongelati. Tuttavia la maggior parte di questi metodi possiedono delle limitazioni di impiego pratico sia in termini di tempo sia perché distruggono la matrice in analisi. Ne consegue che esiste la necessità di un metodo che sia in grado di differenziare tra pesci freschi e congelati-scongelati rapido affidabile e che non sia distruttivo.

Il NIR, nel settore di frutti di mare, è ampiamente usato come tecnica rapida per l'analisi quantitativa e qualitativa (Lin *et al.*, 2006; Uddin *et al.*, 2006). La spettroscopia NIR si è affermata negli ultimi dieci anni come uno degli strumenti più importanti della moderna analisi industriale, in particolare perché produce risultati in tempo reale e perché è non distruttiva (Uddin *et al.*, 2007).

Uddin *et al.* (2005) ha proposto la spettroscopia NIR per indagare lo stato di conservazione del pesce. Tuttavia per una corretta classificazione è necessario che il numero di campioni appartenenti ad un gruppo deve essere il più possibile simili al secondo secondo ed inoltre che i gruppi siano il più diversi possibile. Il congelamento-scongelo comporta una variazione lorda dell'assorbanza dovuta presumibilmente da alterazioni che si verificano nella struttura fisica dello strato superficiale del pesce (Uddin *et al.*, 2005). Inoltre dall'analisi si evidenzia che i campioni congelati-scongelati hanno una struttura più compatta, cioè i punti di dati sono più vicini tra loro, mentre nei campioni freschi, il gruppo non è così ben definito.

Un altro vantaggio è che tutti i risultati pertinenti possono essere visualizzati graficamente consentendo di documentare i dati specifici.

6.9 Considerazioni

Per distinguere tra pesce fresco e congelato-scongelato sono state sopra ricordate varie metodiche tra cui la misura delle proprietà elettriche dei tessuti, l'ispezione del cristallino dell'occhio, la valutazione dell'integrità dei globuli rossi mediante microscopia, o la stima del valore di ematocrito. In pratica, però tutti questi metodi proposti non possono essere applicati a quelle specie di pesci o ai filetti senza sangue, cristallino dell'occhio o pelle. Nel caso in cui vi sia il pesce intero tali tecniche risultano affidabili e alcune sono rapide, tuttavia, se i pesci vengono conservati in frigorifero per un tempo più lungo queste tecniche potrebbero non essere affidabile per tutte le specie. Per differenziare i filetti uno dei metodi enzimatici proposti può essere utilizzato tenendo però presente che l'enzima che dà i migliori risultati dipende in qualche misura dalla specie in esame.

D'altra parte, considerando la natura non invasiva e non distruttiva della spettroscopia NIR, la sua velocità e la robustezza degli strumenti disponibili in commercio oggi, si può prevedere che gli inconvenienti ancora presenti potranno essere presto superati.

7. Scopo del lavoro

Lo scopo di questo studio è quello di valutare le prestazioni del metodo istologico per distinguere tra pesce fresco e congelato-scongelato. Per ottenere questo risultato sono stati allestiti due esperimenti, il primo volto ad individuare le prestazioni del metodo in termini di accuratezza e precisione, il secondo per valutare se i parametri ottenuti fossero applicabili all'enorme varietà di specie di pesci presenti in commercio. Gli esperimenti sono inoltre serviti per valutare il suo potenziale utilizzo in conformità con i requisiti del Regolamento CE n 882/2004 sui controlli ufficiali dei prodotti alimentari e mangimi.

Un terzo esperimento è stato allestito successivamente per valutare l'applicabilità del metodo quale strumento di vigilanza nel settore alimentare. L'obiettivo del terzo studio è valutare se esistano differenze nella tipologia delle alterazioni istologiche da congelamento qualora il prodotto ittico da consumarsi crudo non subisca il processo completo di abbattimento termico richiesto dalla legislazione.

8. Materiali e Metodi

8.1 Primo esperimento

8.1.1 Disegno dell'esperimento

Il primo esperimento è stato allestito per testare preliminarmente le prestazioni del metodo istologico nella distinzione tra pesce fresco e congelato-scongelato. Le prestazioni del metodo sono state valutate in termini di accuratezza e la precisione.

8.1.2 Campionamento ed analisi istologica

Essendo il nostro mercato ricco di numerose specie di pesci si è deciso di lavorare inizialmente su tre delle specie maggiormente presenti sul mercato e procedendo alla scelta si sono individuate tre specie che differissero anche nella composizione lipidica. La scelta è ricaduta su: triglia (*Mullus barbatus*) pesce ad elevato tenore lipidico; orata (*Sparus auratus*) pesce a medio tenore lipidico; e pesce spada (*Xiphias gladius*) pesce a basso tenore lipidico; sono state presi in considerazione pesci di dimensioni commerciali. Esemplari di ciascuna specie prescelta, pescati nel Mar Ligure, sono stati campionati in mercati ittici locali nelle province di La Spezia e Imperia; per ciascuna specie sono stati campionati 71 esemplari. Per ciascun esemplare si è proceduto alla suddivisione in due parti, una posta in ambiente refrigerato la seconda posta a -20°C e poi scongelata a 4°C per 12 h.

Dalla porzione di pesce posta a temperatura di refrigerazione si sono ottenuti tre campioni a cui è stato assegnato il medesimo numero e ciascuno è stato posto in formalina; dalla porzione di pesce congelato a seguito dello scongelamento di 12 ore si sono ottenuti altri 3 campioni anch'essi identificati e posti in formalina. Al termine della preparazione si sono ottenuti per ciascuna specie 71 campioni preparati da matrice fresca e 71 da matrice decongelata da inviare a tre differenti laboratori di istopatologia.

All'arrivo presso i laboratori i tessuti fissati in formalina sono stati processati secondo le procedure standard di ciascun laboratorio, quindi inclusi in paraffina e tagliati ad uno spessore di 3+/-2 µm. I preparati istologici allestiti sono stati colorati con Ematossilina Eosina ed analizzati in cieco da tre diversi istopatologi, uno per laboratorio.

I campioni sono stati identificati e classificati come positivi (congelati-scongelati) se presentavano spazi otticamente vuoti all'interno del citoplasma delle cellule muscolari così come già precedentemente descritto (Nott 1999) o se presentavano spazi a bordo regolare

riempiti con materiale amorfo eosinofilo secondo le indicazioni riportate nella SOP che accompagnava i campioni.

8.1.3 Analisi statistica

I risultati di tutte le letture di ciascun istopatologo sono stati inseriti in un database e poi analizzati utilizzando STATA 10.1 (StataCorp, College Station, TX, USA).

La dimensione del campione ($n = 142$ campioni: 71 positivi + 71 negativi) è stata calcolata come descritto da Fleiss, (2003) per ottenere una sensibilità e specificità prevista di 0,9 e un errore massimo accettato intorno al valore atteso di 0,1. Specificamente, abbiamo voluto valutare la sensibilità (e specificità) del metodo, assumendo una sensibilità prevista (e specificità) pari a 0,9 e un intervallo di confidenza 95% non più largo di $0,10 * 2 = 0,20$.

La sensibilità e specificità del metodo sono state stimate confrontando i risultati istologici con il gold standard, cioè, pesce fresco o congelato-scongelato secondo la procedura descritta (Altman *et al.*, 1991; Fleiss *et al.*, 2003)..

La precisione è stata determinata misurando l'accordo tra i risultati ottenuti da tre diversi patologi di tre laboratori diversi di istopatologia calcolando la k di Cohen per ogni coppia di laboratori e per tutti e tre i laboratori (Altman *et al.*, 1991; Fleiss *et al.*, 2003; Shoukri *et al.*, 2004)..

8.2 Secondo esperimento

8.2.1 Disegno dell'esperimento

Il secondo esperimento è stato allestito per valutare se i criteri diagnostici applicati nel primo esperimento potessero essere estesi ad altre numerose specie ittiche, nonché per verificare se il metodo fosse idoneo anche per verificare l'avvenuto abbattimento termico (congelamento a -20°C per 24 h) obbligatorio ogni qualvolta si voglia servire del pesce crudo per prevenire l'anisakiasi umana.

8.2.2 Campionamento ed analisi istologica

A tal fine abbiamo analizzato 113 campioni comprendenti 35 diverse specie di pesci del Mar Ligure, diversi per composizione di proteine e di grassi.

A questo scopo, 3 fette dello spessore di 0,5 cm sono state campionate da tutti i pesci: la prima fetta è stata immediatamente fissata in formalina tamponata, la seconda e la terza sono state rispettivamente congelate a -20°C per 24 h e a -80°C per 24 h, e successivamente, sono state scongelate a $+4^{\circ}\text{C}$ e fissate in formalina.

Ogni campione è stato processato ed incluso secondo le procedure eseguite nel primo esperimento. I preparati sono stati quindi esaminati in modo indipendente da tre patologi e utilizzando i medesimi criteri del primo esperimento.

8.2.3 Analisi statistica

I risultati di tutte le letture di ciascun istopatologo sono stati inseriti in un database e poi analizzati utilizzando STATA 10.1 (StataCorp, College Station, TX, USA).

La numerosità minima del campione da analizzare è stata fissata in 101 e calcolata, come descritto da Shoukri, (2004), con un kappa previsto di 0,75, e la precisione assoluta impostata a 0,15. La dimensione del campione è stata aumentata a 113 per evitare che la perdita di campioni potesse inficiare i risultati.

La sensibilità e specificità del metodo sono state stimate confrontando i risultati istologici con il gold standard, cioè, pesce fresco o congelato-scongelato secondo la procedura descritta (Altman *et al.*, 1991; Fleiss *et al.*, 2003). La precisione è stata determinata misurando l'accordo tra i risultati ottenuti da tre diversi patologi e calcolando la *k* di Cohen per ogni coppia di esperti (Altman *et al.*, 1991; Fleiss *et al.*, 2003; Shoukri *et al.*, 2004).

8.3 Terzo esperimento

8.3.1 Disegno dell'esperimento

L'obiettivo del terzo studio è valutare se esistano differenze nella tipologia delle alterazioni istologiche da congelamento qualora il prodotto ittico da consumarsi crudo non subisca il processo completo di abbattimento termico richiesto dalla legislazione.

8.3.2 Campionamento

Lo studio ha previsto il prelievo di circa 10 campioni di muscolo, distribuiti tra pesci a carne rossa e pesci a carne bianca, e più precisamente: 4 palamite (*Sarda sarda*), 2 tonni alalunga (*Thunnus alalunga*), 2 salmoni (*Salmo salar*), 1 tonnetto alletterato (*Euthynnus alletteratus*) ed 1 rombo chiodato (*Psetta maxima*).

Su tutti i campioni sono state previste le analisi sintetizzate nella Tabella 1.

Tabella 1: Campioni analizzati per singola tipologia di esame.

In tabella la tipologia di analisi è riportata sinteticamente. Si fa inoltre riferimento al quantitativo in g richiesto per ciascuna analisi e alla tipologia di campione analizzato (fresco, congelato o entrambe le tipologie).

*: si fa riferimento a 24 h esatte per l'esame istologico, per gli altri esami il numero di ore può essere maggiore di 24 h.

**: il quantitativo è direttamente proporzionale alle dimensioni del pesce intero, si faccia riferimento anche al liquido di scongelamento e non solo al tessuto muscolare.

***: la ricerca e quantificazione dell'istamina è avvenuta solo nelle specie considerate più a rischio, quali tonno, palamita, tonnetto.

<i>Tipologia dell'analisi</i>	<i>campioni previsti</i>	<i>campioni effettuati</i>	<i>quantità tot. /analisi</i>	<i>arrivo (fresco)</i>	<i>congelato 12 h</i>	<i>congelato 24 h *</i>
istologica	8	8	120 g	40 g	40 g	40 g
microbiologica	8	8	200 g	100 g	-	100 g
Norovirus	4	10	50 g	-	-	50 g
mercurio	5	8	100-400g**	-	-	100-400 g
istamina	5	7***	50 g	-	-	50 g
identificazione di specie	secondo necessità	2	10 g	-	-	10 g

8.3.3 Esame istologico

Da ciascun esemplare sono stati prelevati tre campioni di muscolo di circa 40 g di peso, ognuno dei campioni rispondeva ad una delle tre diverse condizioni richieste dallo studio (si consideri che per abbattimento termico/congelamento si intende una temperatura di -20°C +/- 2°C):

1. 0 h di abbattimento termico, quindi all'arrivo del prodotto dichiarato fresco;
2. 12 h di abbattimento termico;
3. 24 h di abbattimento termico.

Dopo fissazione in formaldeide al 4% neutra (tamponata con fosfati 0,05 M) sono state ottenute 4 sezioni da ogni singolo campione che sono state posizionate in biocassette. Il contenuto di ciascuna biocassetta è stato quindi processato ed incluso in paraffina. Si è quindi proceduto, dopo il taglio al microtomo e alla colorazione in Ematossilina ed Eosina, all'analisi microscopica dei preparati.

Ciascun preparato è stato analizzato secondo i criteri derivanti dai primi due esperimenti. I campioni a 0 h di abbattimento termico sono stati analizzati per stabilire se la freschezza dichiarata all'arrivo del pesce presso l'esercizio commerciale fosse reale o fittizia; mentre per le sezioni ottenute dai campioni sottoposti a 12 e 24 ore di abbattimento termico si è approfondita l'analisi andando a classificare le alterazioni in microvacuoli (grandi meno della metà della fibrocellula muscolare) e macrovacuoli (grandezza maggiore di metà della fibrocellula muscolare). Inoltre è stato attribuito a ciascun preparato istologico un grading della distribuzione sia dei macro che dei microvacuoli in tre classi: rari (focali), sparsi (multifocali), diffusi.

I dati raccolti sono stati analizzati in modo descrittivo, valutando la presenza di campioni dichiarati freschi che presentavano invece alterazioni tipiche del congelamento all'esame istologico e descrivendo la distribuzione dei microvacuoli e macrovacuoli nei campioni esaminati, per poi stimare i quadri di distribuzione più frequenti.

8.3.4 Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati analizzati applicando un modello di regressione gerarchico in modo da verificare se, sulla base della caratterizzazione delle alterazioni istologiche, emergono differenze statisticamente significative tra muscoli di pesce sottoposti a periodi di congelamento diversi (24 h e 12 h).

8.3.5 Analisi batteriologiche

Per le analisi microbiologiche sono stati prelevati, per ciascun pesce campionato, due porzioni di circa 100 g di muscolo, in modo da verificare i parametri microbiologici nelle seguenti condizioni:

- Campione fresco, senza abbattimento termico;

- Campione congelato, dopo 24h di abbattimento termico e conseguente scongelamento in modo da riprodurre le condizioni in cui il pesce viene consumato crudo.

Le analisi effettuate su entrambi i tipi di campione per ciascun pesce sono state le seguenti:

- *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivo (ISO 16649-2:2001);
- Carica mesofila totale a 30° (ISO 4833:2003);
- Stafilococchi coagulasi positivi (ISO 6888-2/Amd 1:2003);
- *Salmonella* spp (ISO 6579: 2002/Corr. 1:2004);
- *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* (ISO/TS 21872-1:2007).

8.3.6 Analisi virologiche

È stata effettuata in parallelo la ricerca di Norovirus con l'utilizzo di una metodica pcr-real time fornita dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (Istituto Superiore di Sanità). Il quantitativo di matrice richiesto da ciascuna analisi effettuata è stato di circa 50 g. La ricerca di Norovirus in uno dei campioni è attualmente in corso.

8.3.7 Analisi chimiche:

Per la ricerca dei residui di mercurio è stato utilizzato un campione congelato di muscolo variabile dai 100 g ai 400 g a seconda delle dimensioni del pesce. E' stata utilizzata una metodica interna accreditata, Thermal Decomposition Amalgamation Atomic Adsorption Spectroscopy (TDA-AAS).

La ricerca dell'amina vasoattiva istamina è avvenuta su un campione di circa 50 g. Tale esame è stato effettuato sulle specie target, per un totale di sette analisi (2 tonni alalunga, 4 palamite, 1 tonnetto alletterato) una delle quali è ancora in corso. La metodica interna utilizzata, HPLC/DAD, è accreditata.

8.3.8 Identificazione di specie

E' stata effettuata l'identificazione biomolecolare di specie per 2 pesci (un rombo chiodato e una palamita) che al momento del campionamento presentavano caratteristiche morfologiche tali da rendere dubbia la veridicità dell'etichetta. La metodica, validata e accreditata, sfrutta la tecnica FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing) che combina il sequenziamento dei marcatori genetici *cytb* e/o *COI* caratteristici per ciascuna specie animale e l'analisi filogenetica.

9. Risultati

9.1 Primo esperimento

La distribuzione delle alterazioni nei campioni è apparsa abbastanza omogenea.

I risultati delle letture dei preparati del primo esperimento sono riportati nelle Tabelle 2 e 3. Tali risultati sono stati utilizzati per valutare l'accuratezza (sensibilità; specificità) e la precisione (riproducibilità) del metodo. Valori molto elevati di sensibilità (Sensibilità media: 97.63% (95% CI 91.14 - 99.45) e specificità (Specificità media: 98.44% (95% CI 92.43-99.69) sono stati ottenuti dall'analisi dei risultati dei tre patologi appartenenti ai tre laboratori, sebbene la perfetta prestazione diagnostica non è stata raggiunta per tutti i campioni di *Mullus barbatus*. Dall'analisi dei risultati la riproducibilità del metodo tra i laboratori è risultata buona, infatti il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% per la kappa di Cohen è stato superiore a 0,6 in tutti i confronti tra i laboratori ed il valore di Kappa-combined è stato di 0.93 con IC95%:0.87 – 0.98.

Aspetti microscopiche delle fibre muscolari delle tre specie (positivo e negativo) incluse nel primo esperimento sono illustrati nella Figura 6.

Tab. 2. ACCURATEZZA DEL METODO NEL DISTINGUERE TRA PESCE FRESCO E PESCE CONGELATO-SCONGELATO.

Sensibilità (*Se*) e Specificità (*Sp*) con 95% di intervallo di confidenza (95% CI).

	Lab 1		Lab 2		Lab 3		Lab 1		Lab 2		Lab 3		Lab 1		Lab 2		Lab 3	
	<i>Sparus aurata</i>		<i>Sparus aurata</i>		<i>Sparus aurata</i>		<i>Mullus barbatus</i>		<i>Mullus barbatus</i>		<i>Mullus barbatus</i>		<i>Xiphias gladius</i>		<i>Xiphias gladius</i>		<i>Xiphias gladius</i>	
Scongelato	71	0	71	0	68	3	66	4	66	4	67	3	70	1	71	0	71	0
Fresco	0	71	0	71	0	71	1	71	3	69	2	69	4	67	0	71	0	71
<i>Se</i>%	100		100		95.8		94.3		94.3		95.7		98.6		100		100	
(95% CI)	(94.9-100)		(94.9-100)		(88.1-99.1)		(86.0-98.4)		(86.0-98.4)		(88.0-99.1)		(92.4-100)		(94.9-100)		(94.9-100)	
<i>Sp</i>%	100		100		100		98.6		95.8		97.2		94.4		100		100	
(95% CI)	(94.9-100)		(94.9-100)		(94.9-100)		(92.5-100)		(88.3-99.1)		(90.2-99.7)		(86.2-98.4)		(94.9-100)		(94.9-100)	

Sensibilità media: 97.63% (95% CI 91.14 - 99.45)

Specificità media: 98.44% (95% CI 92.43- 99.69)

Tab 3. PRECISIONE DEL METODO NEL DISTINGUERE TRA PESCE FRESCO E PESCE CONGELATO-SCONGELATO

Kappa di Cohen con 95% di intervallo di confidenza(95% CI).

<i>Sparus aurata</i>	Lab 2	Lab 3
Lab 1	1.00 (0.84-1)	0.96 (0.79-1)
Lab 2		0.96 (0.79-1)
	Kappa-combined = 0.97 (0.88-1)	

<i>Mullus barbatus</i>	Lab 2	Lab 3
Lab 1	0.86 (0.69-1)	0.89 (0.72-1)
Lab 2		0.83 (0.66-0.99)
	Kappa-combined = 0.86 (0.76-0.95)	

<i>Xiphias gladius</i>	Lab 2	Lab 3
Lab 1	0.93 (0.77-1)	0.93 (0.77-1)
Lab 2		1.00 (0.84-1)
	Kappa-combined = 0.95 (0.86-1)	

Kappa-combined (95% CI) 0.93 (0.87 – 0.98)

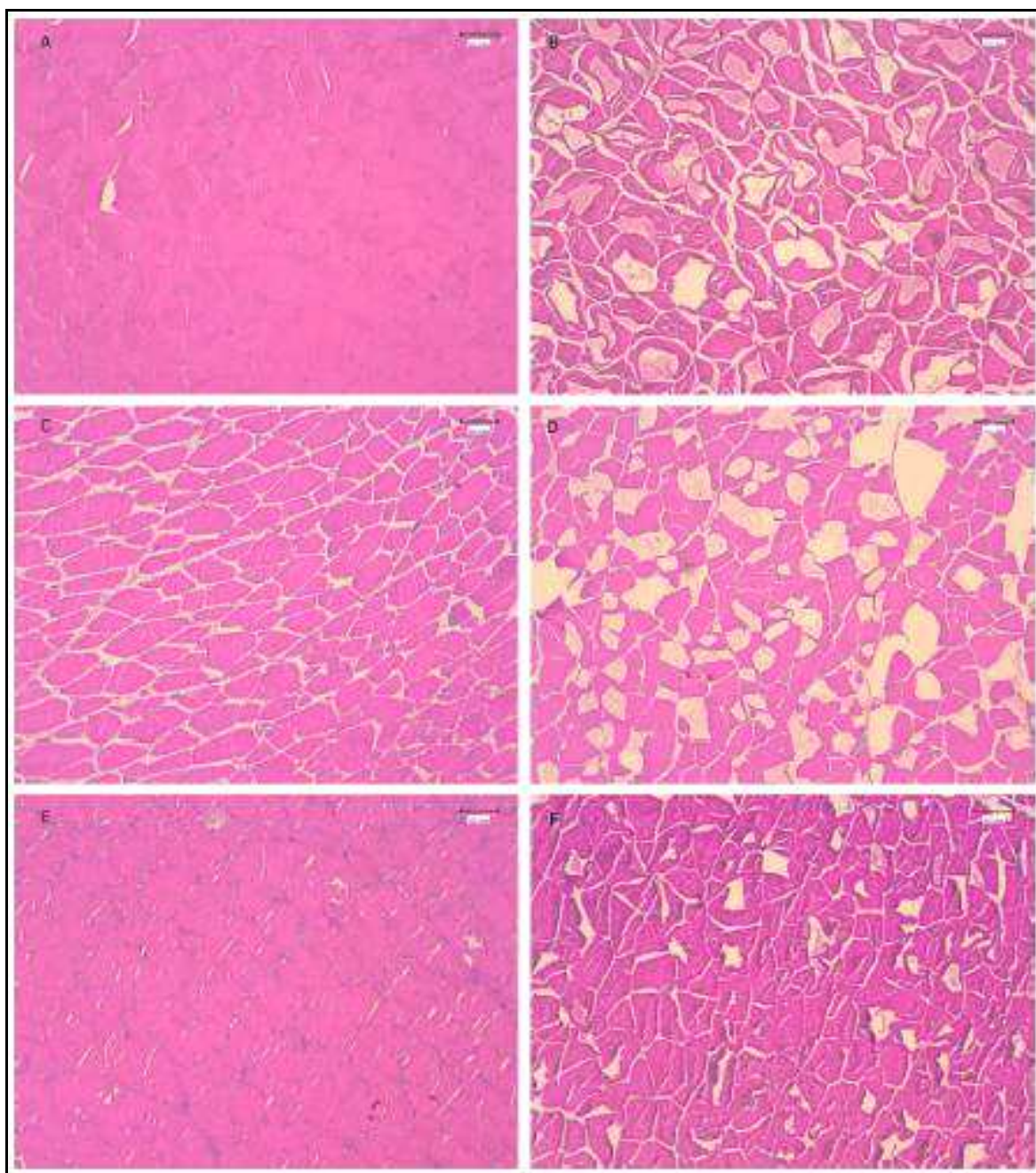


Figura 6: Quadri microscopici caratteristici di pesci decongelati (positivi) e freschi (negativi) di tre diverse specie. (A) *Sparus auratus*, negativo; (B) *Sparus auratus*, positivo; (C) *Xiphias gladius*, negativo; (D) *Xiphias gladius*, positivo; (E) *Mullus barbatus*, negativo; (F) *Mullus barbatus*, positivo.

9.2 Secondo esperimento

La distribuzione delle alterazioni nei campioni è apparsa abbastanza omogenea. Le alterazioni correlate con il congelamento sono state meno gravi di quelle osservate nei campioni del primo esperimento, che erano stati congelati per un periodo più lungo.

In questo esperimento alcuni campioni non potevano essere classificati come positivo o negativo seguendo le indicazioni della SOP a causa di risultati microscopici non specifici. Per tali casi è stata creata una nuova categoria definita non-conclusivi (NC).

I risultati di accuratezza e precisione del metodo ottenuti nel secondo esperimento sono riportati nelle Tabelle 4 e 5.

La sensibilità e la precisione sono state caratterizzate da valori elevati (Sensibilità media 94.57% (95% CI 87.62% -98.11%); Specificità media 97.53% (95% CI 83.39% - 99.70%)), mentre la riproducibilità è risultata leggermente inferiore rispetto a quella ottenuta nella prima valutazione (Kappa-combined 0.66 (95% IC 0.57 – 0.75)).

Tab 4. ACCURATEZZA DEL METODO NEL DISTINGUERE TRA PESCE FRESCO E PESCE CONGELATO-SCONGELATO.

Sensibilità (*Se*) e Specificità (*Sp*) con 95% di intervallo di confidenza (95% CI).

Gold standard	Esperto 1		Esperto 2		Esperto 3	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Scongelato	82	4	78	8	84	2
Fresco	0	27	0	27	2	25
<i>Se</i>%	95.4		90.7		97.7	
(95% CI)	(88.5-98.7)		(82.5-95.9)		(91.9-99.7)	
<i>Sp</i>%	100		100		92.6	
(95%CI)	(87.2-100)		(87.2-100)		(75.7-99.1)	

Sensibilità media 94.57% (95% CI 87.62% -98.11%)

Specificità media 97.53% (95% CI 83.39% - 99.70%)

Tab 5. PRECISIONE DEL METODO NEL DISTINGUERE TRA PESCE FRESCO E PESCE CONGELATO-SCONGELATO

Kappa di Cohen con 95% di intervallo di confidenza (95% CI)

Esperto 2				
Esperto 1		Scongelato	Fresco	NC
	Scongelato	69	7	2
	Fresco	2	28	1
	NC	4	0	0
	Cohen's kappa = 0.69 (0.52 – 0.86)			

Esperto 3				
Esperto 1		Scongelato	Fresco	NC
	Scongelato	67	1	10
	Fresco	4	26	1
	NC	3	0	1
	Cohen's kappa = 0.65 (0.50 – 0.80)			

Esperto 3				
Esperto 2		Scongelato	Fresco	NC
	Scongelato	66	0	9
	Fresco	5	27	3
	NC	3	0	0
	kappa di Cohen = 0.64 (0.49 – 0.79)			

Kappa-combined (95% CI) 0.66 (0.57 – 0.75) ; NC: non conclusivo.

9.3 Terzo esperimento

9.3.1 Esame istologico

Nove pesci pervenuti come freschi sono risultati tali all'esame istologico, ovvero non presentavano né microvacuoli né macrovacuoli. Un campione di tonno alalunga è risultato all'esame istologico già congelato al momento della consegna, è stato quindi escluso da ulteriori valutazioni. Il giudizio per i nove campioni conformi era unitario per cluster di preparati istologici nelle stesse condizioni di trattamento sperimentale (congelati e non) ovvero in ciascun gruppo di 4 preparati istologici di pesce fresco non erano presenti vacuoli o alterazioni ambigue, al contrario in seguito a congelamento per 12 e 24 h erano sempre presenti microvacuoli e macrovacuoli o almeno uno dei due tipi di alterazioni.

Le valutazioni della presenza e della distribuzione dei microvacuoli e dei macrovacuoli, a seconda del numero di ore di congelamento della massa muscolare, sono sintetizzate nelle Tabelle 6 e 7 e rappresentate graficamente nella Figura 7 e nella Figura 8.

Tabella 6: Conteggio sommatorio della distribuzione dei microvacuoli nei preparati istologici esaminati.

MICROVACUOLI		
DISTRIBUZIONE	12 h abbattimento termico	24 h abbattimento termico
Disseminati	17	11
Multifocali	17	21
Focali	2	4
TOT	36	36

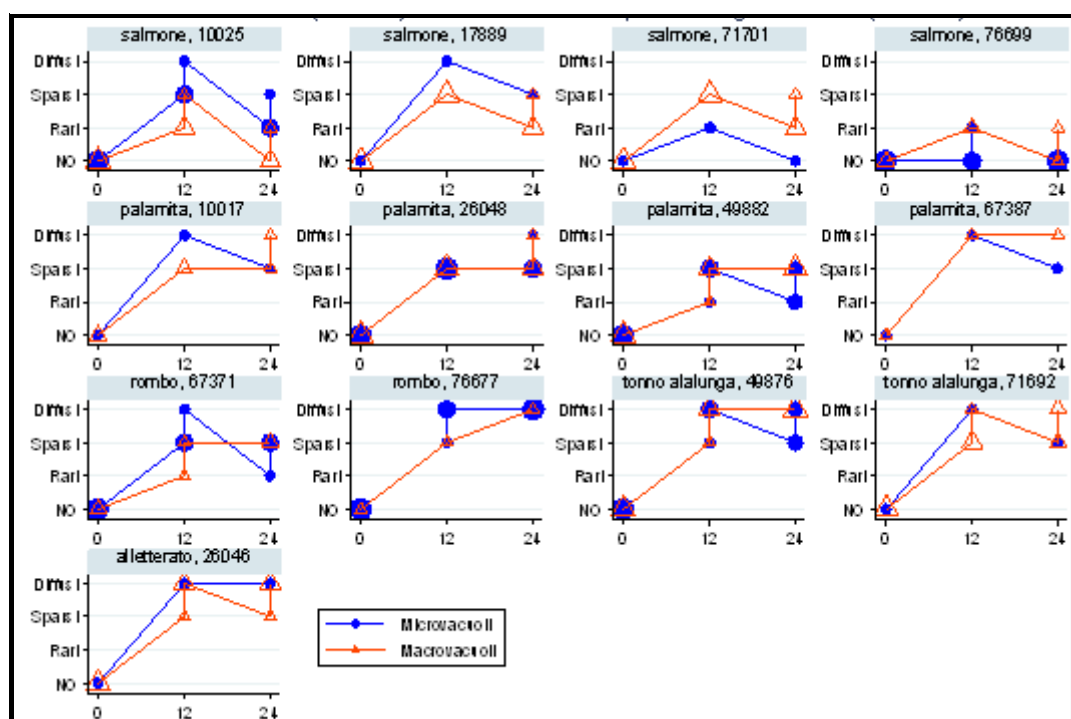
Tabella 7: Conteggio sommatorio della distribuzione dei macrovacuoli nei preparati istologici esaminati.

MACROVACUOLI		
DISTRIBUZIONE	12 h abbattimento termico	24 h abbattimento termico
Disseminati	10	14
Multifocali	22	13
Focali	4	7
Assenza	0	2
TOT	36	36

Figura 7: Rappresentazione grafica delle alterazioni rilevate (asse Y) al variare del tempo di congelamento (asse X).

In azzurro sono rappresentati i microvacuoli, in rosso i macrovacuoli.

La dimensione dei cerchi e dei triangoli rappresentano il numero di sezioni esaminate.



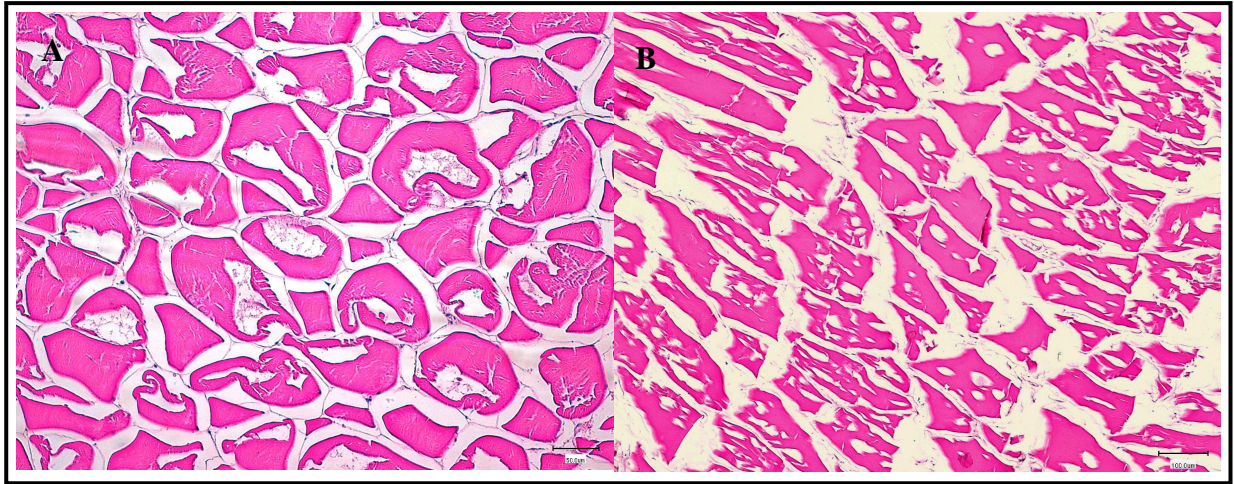


Figura 8: Quadri microscopici caratteristici di macro (A) e micro vacuoli (B)

9.3.2 Analisi batteriologiche

In tutti i campioni analizzati non si è mai rilevata la presenza di germi patogeni. Il conteggio di *Escherichia coli* e stafilococchi coagulasi positivi si è sempre mantenuto al di sotto del LOD del metodo utilizzato e il conteggio della carica batterica totale ha evidenziato livelli di contaminazione accettabili. I risultati sono riassunti nelle tabelle 8 e 9.

9.3.3 Analisi virologiche

In nessuno dei campioni analizzati, inoltre, è stata evidenziata la presenza di Norovirus. I risultati sono riassunti nelle tabelle 8 e 9.

Tabella 8: Risultati delle analisi microbiologiche dei campioni freschi;

*: tali campioni non sono stati esaminati a causa del prelievo di matrice insufficiente.

CAMPIONI FRESCHI					
SPECIE	CMT30(UFC/g)	E.Coli (UFC/g)	Salmonella	Stafilococchi (UFC/g)	Vibrio patogeni
Salmone	490.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Palamita	9.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Salmone	620.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Tonno alalunga*	17.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Tonnetto	12.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Palamita	<400	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Tonno alalunga	_**	_**	_**	_**	_**
Palamita	_**	_**	_**	_**	_**
Palamita	120.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Rombo	250.000	<10	Neg in 25g	<400	Neg in 25g

Tabella 9: Risultati delle analisi microbiologiche dei campioni congelati:

*: tali campioni non sono stati esaminati a causa del prelievo di matrice insufficiente.

CAMPIONI FRESCHI					
SPECIE	CMT30 (UFC/g)	E. coli (UFC/g)	Salmonella	Stafilococchi (UFC/g)	Vibrio patogeni
Salmone	150.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Palamita	16.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Salmone	71.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Tonno alalunga*	<4.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Tonnetto	62.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Palamita	13.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Tonno alalunga	_*	_*	_*	_*	_*
Palamita	_*	_*	_*	_*	_*
Palamita	18.000	<10	Neg in 25g	<100	Neg in 25g
Rombo	13.000	<10	Neg in 25g	<400	Neg in 25g

9.3.4 Analisi chimiche

La quantificazione del mercurio ha prodotto un risultato non conforme, relativo ad un tonnetto alletterato, per il quale il valore era di 2,7 mg/Kg all'interno del campione di massa muscolare di circa 300 g analizzato. I risultati sono sintetizzati in Tabella 10.

Per quanto riguarda l'istamina, da nessuno dei sette campioni analizzati è stata rilevata tale amina a valori sensibili.

Tabella 10: Quantificazione del mercurio totale nei campioni analizzati;

*: tali campioni non sono stati esaminati a causa del prelievo di matrice insufficiente;

**: risultato non conforme, superiore ai limiti previsti dalla legge.

Specie	Mercurio (mg/kg)
Salmone	non quantificabile
Palamita	0,58
Salmone	_*
Tonno alalunga	0,89
Tonnetto alletterato	2,7**
Palamita	0,28
Tonno alalunga	0,31
Palamita	0,33
Palamita	0,85
Rombo	non quantificabile

9.3.5 Identificazione di specie

I due pesci analizzati sono risultati conformi per ciò che riguardava la specie riportata in etichetta, ovvero si trattava di un esemplare di rombo chiodato (*Psetta maxima*) e uno di palamita (*Sarda sarda*).

10. Discussione e conclusioni

L'analisi microscopica degli alimenti così come quella dei tessuti degli animali destinati a divenire alimento per l'uomo è una pratica conosciuta da molto tempo ma che negli ultimi sembra essere applicata ed affrontata con finalità diverse, cercando di renderla maggiormente oggettiva ed adatta ad essere applicata in conformità alla legislazione vigente nel controllo degli alimenti cercando così di valutarne le prestazioni in termini di sensibilità, specificità e ripetibilità. Questo nuovo approccio da qualche anno applicato nel campo dell'analisi dei tessuti animali al fine di identificare trattamenti farmacologici non dichiarati per evitare di esporre il consumatore a sostanze a lui non note e potenzialmente nocive, viene in questo studio esteso al campo del settore ittico al fine di valutare lo stato di conservazione di prodotti sempre più richiesti dal consumatore.

Fornire in etichetta informazioni sui metodi di conservazione dei prodotti della pesca è fondamentale per la percezione della qualità del prodotto da parte del consumatore finale. La vendita di pesce scongelato per prodotto fresco, costituisce non solo una frode qualitativa, a causa dei cambiamenti fisici che avvengono nei prodotti sottoposti a congelamento/scongelamento. Infatti tali procedure inficiano il valore nutrizionale e la durata di conservazione dei prodotti, costituendo una frode in commercio, per l'obbligo di riferire le condizioni di conservazione del prodotto in etichetta (Reg. 852/2004). Inoltre, la dichiarazione veritiera delle condizioni di conservazione del prodotto (fresco-scongelato) ha lo scopo di garantire la salute pubblica se il pesce è servito per il consumo crudo.

Questo studio ha preso in considerazione un metodo rapido, semplice ed estremamente preciso come l'istologia per distinguere tra pesce fresco e congelato-scongelato, indipendentemente dalle specie ittiche in esame. Al fine di testare la robustezza della tecnica, abbiamo valutato i cambiamenti causati dalle procedure di congelamento-scongelamento sulle specie ittiche più comunemente vendute e consumate in Italia.

Uno dei limiti dell'esame istologico è la sua variabilità dipendente dall'operatore che effettua la lettura. Nei tre laboratori coinvolti nello studio erano presenti istologici esperti, anche se non specificatamente addestrati a individuare modificazioni specifiche indotte dal congelamento. Tuttavia, l'accuratezza diagnostica del metodo, espressa sulla base della descrizione fornita dalla Procedura Operativa Standard (SOP), ha portato ad un risultato quasi perfetto che in futuro potrebbe mantenersi tale o potrebbe addirittura avere un margine di

miglioramento a seguito di formazione frontale degli operatori e di inserimento di materiale fotografico di riferimento allegato alla SOP accreditata e distribuito a ciascun operatore coinvolto nella diagnosi.

Le alterazioni indotte dal congelamento sono risultate diffuse e anche se alcune aree del vetrino risultavano più intensamente interessate dai cambiamenti microscopici congelamento-specifici, questi potevano essere riconosciuti ovunque senza difficoltà suggerendo che nessuna particolare attenzione deve essere posta al sito di campionamento. A supporto della validità della metodica si pongono i risultati dei primi due esperimenti dalla cui analisi si possono notare pochi risultati falsi positivi (pesci freschi identificati come congelati). Tali imprecisioni però potrebbero ulteriormente ridursi se si considera che il metodo nella maggior parte dei casi può essere applicato a diversi campioni dello stesso lotto, e questo a supporto che un corretto campionamento correlato alla dimensione della partita (lotto) porterebbe alla corretta identificazione delle condizioni di conservazione del pesce. L'analisi di specie con differente composizione di grasso e proteine è stato probabilmente il motivo dell'insorgenza di alcuni cambiamenti non specifici che hanno portato ad una lieve riduzione nell'accuratezza del metodo e nella precisione registrata nel secondo esperimento. Tuttavia, vale la pena notare che l'ampliamento dello studio di specie di pesci ha annesso anche specie che raramente rientrano nelle abitudini alimentari dei consumatori europei e che solo occasionalmente dovrebbero essere sottoposte a pratiche fraudolente a causa dello scarso valore economico delle stesse; tale criterio è stato però adottato come un approccio precauzionale, come previsto per la sicurezza alimentare .

Quando si confrontano le prestazioni del metodo istologico con quelle di altri metodi diagnostici per l'identificazione dello stato di conservazione del pesce, possiamo concludere che l'istopatologia può garantire le migliori prestazioni in termini di accuratezza e precisione, così come la semplicità di esecuzione, il che fa sì che lo si possa suggerire come metodo di routine nei laboratori che effettuano i controlli ufficiali. Ulteriori ricerche dovranno concentrarsi sull'ottimizzazione dei tempi di lavorazione dei campioni da sottoporre ad analisi istologica per soddisfare i requisiti della shelf-life dei prodotti ittici.

Il terzo studio è nato dall'esigenza di creare una rete di collaborazione multidisciplinare che potesse affrontare in maniera rigorosa le tematiche sanitarie relative ai prodotti ittici. Si è infatti cercato di toccare gli aspetti più salienti delle problematiche sanitarie relative alle frodi commerciali più comuni in tali prodotti (di dichiarazione mendace di freschezza e di sostituzione di specie), quali la prevenzione dall'esposizione del consumatore al rischio Anisakis nel pesce crudo, la presenza di mercurio nei pesci predatori,

il problema dei Norovirus, che spesso viene trascurato, e non ultimo i controlli sull'istamina che può a sua volta creare gravi danni alla salute del consumatore, con la ben nota sindrome sgombroide. Non abbiamo ovviamente trascurato i parametri di sicurezza alimentare, con la ricerca di germi patogeni, e gli indicatori di igiene di processo e di deteriorabilità, mediante il conteggio di *E. coli* e della carica mesofila totale.

Il campionamento è stato orientato verso i pesci a carne rossa a causa del fatto che nel caso specifico questi vengono preferiti nella preparazione crude di stampo giapponese. Si dovranno implementare in futuro i campioni di pesce a carne bianca per analizzare anche le eventuali problematiche a carico di questa categoria.

I risultati ottenuti, se da un lato sono confortanti, dall'altro sollevano alcune problematiche su tali prodotti alimentari. Il numero di campioni al momento limitato non permette di effettuare considerazioni con valenza statistica, ma è importante notare come la dichiarazione di freschezza riportata sulla documentazione di trasporto di uno dei campioni analizzati (esperimento 3) non sia stata confermata. Tale risultato supporta l'ipotesi che è pratica comune prolungare la vita commerciale dei pesci, soprattutto quelli che richiedono lunghi periodi di trasporto dalla zona di pesca o quelli di elevato valore commerciale, quindi probabilmente è una problematica che affligge maggiormente i pesci pescati rispetto a quelli allevati.

Analizzando nel dettaglio la presenza e la distribuzione dei microvacuoli si può dire che essi sono presenti in tutti i preparati istologici ed appaiono parimenti diffusi e sparsi dopo congelamento di 12h, mentre dopo 24h di congelamento sembra che prevalga il quadro multifocale rispetto al diffuso. I casi di distribuzione focale sono assai esigui, anche se il doppio nei preparati istologici di campioni congelati per 24h. Per quanto concerne i macrovacuoli essi appaiono prevalentemente sparsi a 12h e diffusi dopo 24h di congelamento. Il quadro focale è più rappresentato per questa tipologia di vacuoli, con 7 quadri focali nei campioni sottoposti a 24h di congelamento. In sintesi si può ipotizzare che i microvacuoli, dapprima diffusi a 12h, diventino sparsi allorché il congelamento prosegue probabilmente perché, almeno in parte, si possano modificare in macrovacuoli. Ciò verrebbe confermato dal fatto che invece i macrovacuoli sono prevalentemente diffusi a 24h, mentre sono sparsi a 12h di congelamento. Tale ipotesi verrà valutata dall'analisi statistica che verrà condotta a seguito dell'ampliamento dei campioni analizzati e consentirà di arricchire i risultati finora ottenuti e le conclusioni suggerite da questi primi risultati, con il valore aggiunto rappresentato dal livello di probabilità con cui queste potranno essere sostenute e, le eventuali differenze emerse, considerate statisticamente significative.

Per quanto riguarda i dati microbiologici, si può affermare che non siano stati riscontrate particolari degni di nota. Non si è inoltre rilevata la presenza di Norovirus; si noti che la maggior parte dei campionamenti sono avvenuti con temperature miti o calde, mentre il picco della malattia si raggiunge in inverno (Dancer *et al.*, 2010). L'assenza di tale virus denota inoltre le corrette pratiche igieniche messe in atto dagli operatori.

Le analisi chimiche sono state favorevoli per quanto riguarda la rilevazione dell'istamina, ricercata in specie più soggette a questa problematica. Essa deriva dall'istidina libera, presente in maggiore quantità nella muscolatura di alcune specie ittiche a carne rossa, a livello inter ed intracellulare, oltre che nel sangue. Le famiglie di pesci più a rischio sono: Scombridae (tonno, sgombero) Clupeidae (sardina, aringa, spratto, alaccia, cheppia), Engraulidae (acciuga). I risultati sono coerenti con le modalità di conservazione ed il breve periodo commerciali delle specie target analizzate (Visciano *et al.*, 2012). E' invece importante notare che i livelli di mercurio in un campione di tonnetto alletterato erano tre volte più alti della norma. I pesci sono spesso degli accumulatori di mercurio (Storelli *et al.*, 2012), che è presente in maggior quantità in forma organica. In particolar modo i pesci carnivori, tra i quali i tonni, sono maggiormente toccati da questa problematica a causa delle abitudini alimentari.

L'identificazione di specie effettuata su due campioni dubbi confermava le specie dichiarate. Si noti che si trattava di pesci già sfilettati.

Il pesce oggi è considerato dai consumatori come un alimento al quale sono riconosciute una lunga serie di proprietà nutritive. Ciò rende necessario tutelarlo ed anche conoscerne le eventuali problematiche connesse al consumo ormai non più sporadico a causa delle nuove mode alimentari che lo hanno affermato ormai come abitudine alimentare in una larga parte della popolazione. Ne deriva la necessità di porre maggiore attenzione alle procedure di produzione, conservazione, lavorazione e commercializzazione per garantire la sicurezza e la qualità di questo prodotto, riconoscendo la necessità di ottenere prodotti che abbiano i requisiti di igienicità, gli aspetti di qualità e/o tipicità, e le garanzie di procedimenti produttivi rispettosi del benessere animale e della conservazione dell'ambiente. La legislazione, per venire incontro alle necessità d'informazione dei consumatori e per fornire loro maggiore sicurezza, ha imposto che venga utilizzata un'etichetta che descriva la qualità "tecnica" del pesce. In quest'ambito si può validamente inserire l'analisi microscopica dei tessuti dei prodotti ittici che, come descritto in questo lavoro, potrebbe affiancarsi ad altri tipi di controllo per fornire utili elementi sulle modalità di conservazione dei prodotti ittici immessi sul mercato.

11. Ringraziamenti

Si ringraziano i seguenti laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta per aver eseguito le analisi necessarie per lo svolgimento di tale ricerca:

- SS Laboratorio Istopatologia (Responsabile Dott.ssa Elena Bozzetta);
- S.C. Controllo Alimenti e Igiene Delle Produzioni (Responsabile Dott.ssa Lucia Decastelli);
- S.C. Controllo Chimico e Ambientale con Annesso CREAA (Responsabile Dott.ssa Maria Cesarina Abete);
- S.S. Biostatistica, Epidemiologia e Analisi Del Rischio (Responsabile Dott. Giuseppe Ru);
- S.S. Laboratorio Genetica e Immunobiochimica (Responsabile Dott. Pierluigi Acutis).

Un ringraziamento particolare viene inoltre rivolto alle seguenti persone per aver reso possibile l'esecuzione di tale ricerca:

- Dot.ssa Elena Bozzetta
- Dott.ssa Guia Benedetta Richelmi
- Dott.sse Valentina Audino, Dolores Divietro, Daniela Mascarino, Ornella Maldera e Katia Varello

12. Bibliografia

- Aguilera JM and Stanley DW (1990) Microstructural Principles of Food Processing and Engineering. London/New York: Elsevier.
- Aguilera JM, Stanley DW, and Baker KW (2000) New dimensions in microstructure of food products. Trends in Food Science and Technology 11: 3–9.
- Altman DG. 1991. Practical statistics for medical research, 2nd ed. Chapman & Hall, London
- Barbagli C, Crescenzy GS. 1982. Influence of freezing and thawing on the release of cytochrome oxidase from chicken's liver and from beef and trout muscle. J Food Sci. 46: 491–496.
- Bell GH, Emslie-Smith D, Paterson CR. 1976. Textbook of physiology and biochemistry, 9th ed, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Bozzetta E, Pezzolato M, Maurella C, Varello K, Richelmi GB, Draisci R, Ferranti C, D'Angelo A, Caramelli M. 2011 Development of an enhanced histopathological approach to detect low-dose dexamethasone illicit treatment in veal calves. Food Additives and Contaminants 1187–1192
- Bozzetta E, Pezzolato M, Cencetti E, Varello K, Abramo F, Mutinelli F, Ingravalle F, Teneggi E. 2012. Histology as a valid and reliable tool to differentiate fresh from frozen-thawed fish. J Food Prot. 75(8):1536-41.
- Cannizzo FT, Spada F, Benevelli R, Nebbia C., Giorgi P, Brina N, Bollo E, Biolatti B. 2010. Thymus atrophy and regeneration following dexamethasone administration to beef cattle Veterinary Record 167:338-343
- Chhatbar SK, Velankar NK. 1977. A biochemical test for the distinction of fresh fish from frozen and thawed fish. Fish Technol. 14: 131–133.
- Damodaran ND, Gopakumar K. 1990. Effect of freezing and thawing on press juices enzyme activity in the muscle of farmed fish and shellfish. IIF-IIR, Commission C2, Aberdeen, 3: 229–233.

- Decision 97/296/EC of 6 November 2006 of the Commission Of The European Communities establishing the lists of third countries and territories from which imports of bivalve molluscs, echinoderms, tunicates, marine gastropods and fishery products are permitted. Official Journal L320:53
- Directive 2000/60/EC of the Council of the European Communities of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal L327:1
- Directive 2006/88/EC of the Council of the European Communities of 24 October 2006 on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals. Official Journal L328:14
- Directive 79/923/EEC of the Council of the European Communities, on the quality required of shellfish waters. Official Journal L 281: 47 – 52
- Directive 91/492/EEC of 22 July 1991 of the Council of the European Communities laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products. Official Journal L 268: 15 – 34.
- Directive 91/493/EEC of 22 July 1991 of the Council of the European Communities laying down the health conditions for the production and placing on the market of fishery products. Official Journal L268: 15
- Directive 91/67/EEC of 28 January 1991 of the Council of the European Communities concerning the animal health conditions governing the placing on the market of aquaculture animals and products. Official Journal L 46:1 -18
- Directive 92/48/EEC of 16 June 1992 of the Council of the European Communities laying down the minimum hygiene rules applicable to fishery products caught on board certain vessels in accordance with Article 3(1)(a)(i) of Directive 91/493/EEC- Official Journal L187: p41
- Duflos G, Le Fur B, Mulak V, Becel P, Malle P. 2002. Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets. J Sci Food Agric. 82: 1341–1345.
- FAO. 1982. Reference manual to codes of practice for fish and fishery products. FAO Fish, Circ.750, 217.

- Fernandez M, Mano S, Garcia de Fernando GD, Ordonez JA, Hoz L. 1999. Use of β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) activity to differentiate frozen from unfrozen fish and shellfish. *Eur Food Res Technol.* 209: 205–208.
- Ferrando M and Spiess W. 2000. Confocal scanning laser microscopy: a powerful tool in food science. *Food Science and Technology International* 6: 267–284.
- Fleiss JL, Levin B, Paik MC. 2003. Statistical methods for rates and proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York
- Flint O (ed.) (1994) Food Microscopy, Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers
- Foucat L, Taylor RG, Labas R, Renou JP. 2001. Characterization of frozen fish by NMR imaging and histology. *Am Lab.* 33: 38–43.
- Frigerio R, Ardemagni A, Cantoni C. 1980. Variazioni quantitative della succinodidrogenasi durante la lavorazione di molluschi. *Arch Vet Ital.* 31: 162–166.
- Gottesmann P, Hamm R. 1983. New biochemical methods of differentiating between fresh meat and thawed, frozen meat. *Fleischwirtschaft.* 63: 219–220.
- Gould E, Medler MJ. 1970. Fish and other marine products-test to determine whether shucked oyster have been frozen and thawed. *J Assoc Anal Chem.* 53: 1237–1241.
- Guarda F, Valenza F, Biolatti B, Quaglia F, Emanuel C. 1983 Sull'atrofia precoce del timo inseguito a somministrazione prolungata di glicocorticoidi nei vitelli sanati (Thymus atrophy following glucocorticoids long-term administration in veal calves). *Il Nuovo Progresso Veterinario*, 38, 434-442.
- Gudmundsson M, Hafsteinsson H, 2001. Effect of electric field pulses on microstructure of muscle foods and roes, *Trends Food Sci. Tech.*, 12, 122–128.
- Howgate PF. 1982. Quality Assessment and Quality Control. In: A. Aitken et al. (Eds.), *Fish Handling and Processing* (2nd edition). Her Majesty's Stationary, Edinburgh, pp. 177-186.
- Hoz L, Yustes C, Camara JM, Ramos MA, Garcia de Fernando GD. 1992. β -Hydroxyacyl-CoAdehydrogenase (HADH) differentiates unfrozen from frozen-thawed crawfish (*Procambarus clarkii*) and trout (*Salmo gairdneri*) meat. *Int J Food Sci Technol.* 27: 133–136.

- JAS (Japan Agricultural Standard). 2000. Quality labeling standard for perishable foods. Notification No. 514.
- Kalař M, Allan-Wojtas P, Miller SS. 1995. Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. *Trends in Food Science and Technology* 6: 177–186.
- Karoui R, Thomas E, Dufour E. 2006. Utilisation of a rapid technique based on front-face fluorescence spectroscopy for differentiating between fresh and frozen–thawed fish fillets. *Food Res Inter.* 39: 349–355.
- Karvinen VP, Bamford DH, Granroth B. 1982. Changes in muscle subcellular fraction of Baltic herring (*Clupea harengus* membras). *J Sci Food Agric.* 33: 763–772.
- Kirby AR, Gunning AP, Morris VJ. 1995. Atomicforce microscopy in food research – a new technique comes of age. *Trends in Food Science and Technology* 6: 359–365.
- Kitamikado M, Yuan CS, Ueno R. 1990. An enzymatic method designed to differentiate between fresh and frozen-thawed fish. *J Food Sci.* 55: 74–76.
- Knor G. 1974. Atlas zur anatomie und morphologie der nutzfische, Verlag Paul Parey, Berlin
- Lampila LE, 1990 Comparative microstructure of red meat, poultry and fish muscle, *J. Muscle Foods*, 1, 247–267.
- Larrea V, Perez-Munuera I, Hernando I, Quiles A, Llorca E, Lluch MA, 2007. Microstructural changes in Teruel dry-cured ham during processing, *Meat Sci.*, 76, 574–582.
- Lewis DF. 1993. A tutorial and comprehensive bibliography on the identification of foreign bodies found in food. *Food Structure* 12: 365–378.
- Lin M, Mousavi M, Al-Holy M, Cavinato AG, Rasco BA. 2006. Rapid near infrared spectroscopic method for the detection of spoilage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *J Food Sci.* 71: S18–S23.
- Llorca E, Hernando I, Perez-Munuera I, Fiszman SM, Lluch MA, 2001. Effect of frying on the microstructure of frozen battered squid rings, *Eur. Food Res. Technol.*, 213(6), 448–455.

- Llorca E, Hernando I, Perez-Munuera I, Quiles A, Larrea V, Lluch MA, 2007. Protein breakdown during the preparation of frozen batter-coated squid rings, *Eur. Food Res. Technol.*, 225(5–6),807–813.
- Lluch MA, Perez-Munuera I, Hernando I 2001. Proteins in food structures, in *The Chemical and Functional Properties of Food Proteins*, Sikorski, Z.E. (Ed.), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 2001, chap. 2.
- Love RM. 1956. Post-mortem changes in the lenses of fish eyes. II. Effect of freezing, and their usefulness in determining the past history of the fish. *J Sci Food Agric.* 7: 220–226.
- Love RM. 1970. *The chemical biology of fishes*. Academic press, London.
- McLachlan GJ. 1992. *Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition*. Chichester, U.K.: John Wiley & Sons.
- Nilsson K, Ekstrand B. 1993. The effect of storage on ice and various freezing treatments on enzyme leakage in muscle tissue of rainbow trout. *Z Lebensm Untersuch Forsch.* 197: 3–7.
- Nott KP, Evans SD, Hall LD. 1999. Quantitative magnetic resonance imaging of fresh and frozen-thawed trout. *Magn. Reson. Imaging* 17:445–455
- Ofstad R, Olsen RL, Taylor R, Hanneson KO 2006. Breakdown of intramuscular connective tissue in cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor* O.) related to gaping, *Lebens. Wiss. Tech.*, 39, 1143–1154.
- Okazaki E. 2003. Unpublished data. National Research Institute of Fisheries Science (NRIFS). Yokohama, Japan.
- Okazaki E, Yamashita Y, Uddin M. 2006. Classification of fresh and frozen-thawed fish—a review. *Refrigeration.* 81: 175–181.
- Pagano MR, Paredi ME, Crupkin M. 2005 Cytoskeletal ultrastructure and lipid composition of I-Z-I fraction in muscle from pre- and post spawned female hake (*Merluccius hubbsi*), *Com. Biochem. Physiol. Part B* 141, 13–21.
- Perez-Munuera I, Larrea V, Quiles A, Lluch MA 2008. Microstructure, in *Handbook of Muscle Foods Analysis*, Nollet, L. and Toldra, F. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.

- Pezzolato M, Maurella C, Varello K, Meloni D, Bellino C, Borlatto L, Di Corcia D, Capra P, Caramelli M, Bozzetta E. 2011. High sensitività of a histological method in the detection of low dosage illicit treatment with 17b-estradiol in male calves. Food control, 22:1668-1673.
- Regulation (EC) No 104/2000 of 17 December 1999 on the common organisation of the markets in fishery and aquaculture products. Official Journal L 17: 22–52
- Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Official Journal of the European Communities L 031: 1 - 24
- Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Official Journal of the European Communities L 031: 1 - 24
- Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. Official Journal of the European Communities L 139: 1 -54
- Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal L 139: 55 -205
- Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. Official Journal L 139: 206 -320
- Regulation (EC) No. 882/2004 of the European Parliament and of the Council on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules. Official Journal L 165: 1-141.
- Rehbein H, Kress G, Schreiber W. 1978. An enzymic method for differentiating thawed and fresh fish fillets. J Sci Food Agric. 29: 1076–1082.
- Rehbein H. 1979. Development of an enzymatic method to differentiate fresh and sea-frozen and thawed fish fillets. Z Lebensm Unters-Forsch. 169: 263–265.

- Rehbein H. 1992. Physical and biochemical methods for the differentiation between fresh and frozen thawed fish or fillets. *Ital J Food Sci.* 2: 75–86.
- Rehbein H, Cakli S. 2000. The lysosomal enzyme activities of fresh, cooled, frozen and smoked salmon fish (*Onchorhynchus keta* and *Salmo salar*). *Turkish J Vet Animal Sci.* 24: 103–108.
- Sakaguchi M, Murata M, Kim JB. 1989. The effects of repeated freeze-thaw cycle on torrymeter readings of carp fillets. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 55: 1665–1669.
- Salfi V, Fucetola F, Pannunzio G. 1985. A micromethod for the differentiation of fresh from frozen fish muscle. *J Sci Food Agric.* 36: 811.
- Salfi V, Fucetola F, Verticelli V, Arata P. 1986. Optimized procedures of biochemical analysis for the differentiation between fresh and frozen thawed fish products. Test of mitochondrial malate dehydrogenase. *Ind Alim.* 25: 634.
- Shoukri MM. 2004. Measures of interobserver agreement. Chapman & Hall, London
- Sigurgisladottir S, Ingvarsdottir H, Torrisen OJ, Cardinal M, Hafsteinsson H, 2000. Effects of freezing/ thawing on the microstructure and the texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Food Res. Int.*, 33, 857–865.
- Sikorsi ZE, 1990. *Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, chap. 1.
- Uddin M, Ishizaki S, Okazaki E, Tanaka M. 2002. Near-infrared reflectance spectroscopy for determining end-point temperature of heated fish and shellfish meats. *J Sci Food Agric.* 82: 286–292.
- Uddin M. 2003. Unpublished data. National Research Institute of Fisheries Science (NRIFS). Yokohama, Japan.
- Uddin M, Okazaki E. 2004. Classification of fresh and frozen-thawed fish by near-infrared spectroscopy. *J Food Sci.* 69: C665–668.
- Uddin M, Okazaki E, Fukuda Y. 2005. Classification of fresh and frozen–thawed fish by dry extract spectroscopy by infrared reflection. *NIR News.* 16: 4–7.
- Uddin M, Okazaki E, Turza S, Yumiko Y, Fukuda Y, Tanaka M. 2005. Non-destructive visible/NIR spectroscopy for differentiation of fresh and frozen–thawed fish. *J Food Sci.* 70: C506–C510.

- Uddin M, Okazaki E, Ahmed MU, Fukuda Y, Tanaka M. 2006. NIR spectroscopy: A non-destructive fast technique to verify heat treatment of fish-meat gel. *Food Control*. 17: 660–664.
- Uddin M, Okazaki E, Fukushima H, Turza S, Yumiko Y, Fukuda Y. 2006. Nondestructive determination of water and protein in surimi by near-infrared spectroscopy. *Food Chem*. 69: 491–495
- Uddin M, Okazaki E, Kobayashi Y, Yamashita Y, Kimiya Y, Omura Y. 2006. Identification of Fresh and Frozen-Thawed Pacific Saury by Visible/NIR Spectroscopy. The Japan-Korea Joint NIR Symposium. Paper No. PJ13. Seoul, Korea.
- Uddin M, Turza S, Okazaki E. 2007. Rapid determination of intact sardine fat by NIRS using surface interactance fibre probe. *Int J Food Engine*. 3 (6): Art. 12.
- Uddin M, Kimiya T, Okazaki E. 2008. Near infrared spectroscopy-a rapid and non-destructive technology in seafood analysis. 5th World Fisheries Congress, Key Note Paper No. 4D1 (7). Yokohama, Japan.
- Uslenghi F, Divari S, Cannizzo FT, De Maria R, Spada F, Mulasso C, Pezzolato M, Bozzetta E, Attucci A, Giorgi P, Biolatti B. 2012 Application of absolute qPCR as a screening method to detect illicit 17 β -oestradiol administration in male cattle. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2012 Nov 6. [Epub ahead of print]
- Vascellari M, Capello K, Stefani A, Biancotto G, Moro L, Stella R, Pozza G, Mutinelli F. 2012. Evaluation of thymus morphology and serum cortisol concentration as indirect biomarkers to detect low-dose dexamethasone illegal treatment in beef cattle. *BMC Vet Res*. 3;8:129.
- Wold S. 1976. Pattern recognition by means of disjoint principal components models. *Pattern Recognit*. 8: 127–39.
- Yamashita Y. 2003. Personal communication. National Research Institute of Fisheries Science (NRIFS). Yokohama, Japan.
- Yoshioka K, Kitamikado M. 1983. Differentiation of freeze-thawed fish from fresh fish by the examination of medulla of crystalline lens. *Bull Jpn Soc Sci Fish*. 49: 151–155.
- Yoshioka K, Kitamikado M. 1988. Differentiation of freeze-thawed fish fillet from fresh fish fillet by examination of erythrocyte. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 54: 1221–1225.

Yuan CS, Yoshioka K, Ueno R. 1988. Differentiation of frozen-thawed fish from unfrozen fish by determination of neutral β -N-acetylglucosaminidase activity in the blood. Bull Jpn Soc Sci Fish. 54: 2143–2148.